



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

Efecto del herbicida paraquat en el crecimiento y la actividad
enzimática de lacasa de *Agrocybe pediades* (Fungi: Agaricales) en
cultivo *in vitro*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA:

BIÓL. SELENA SILVA LEON

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

TUTORES:

DR. JAIME MARCIAL QUINO
DR. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ Y PÉREZ

IXTACUIXTLA, TLAXCALA, JULIO, 2022





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Código: 505-RGE-04
Publicación: Diciembre 2020
Revisión: 9001:2015 04

C. SELENA SILVA LEÓN

P R E S E N T E

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de evaluación de examen de grado ha revisado el trabajo de investigación titulado: **"EFECTO DEL HERBICIDA PARAQUAT EN EL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA DE *Agrocybe pediades* (Fungi: Agaricales) EN CULTIVO *in vitro*"**, realizado bajo la dirección de la Dra. Alba Monica Montiel Gonzalez. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

Dra. Arely Anaya Hernández

Dr. José Luis Martínez y Pérez

Dra. Alba Mónica Montiel González

Dr. Jaime Marcial Quino

Dra. Wendy Argelia García Suastegui

[Handwritten signatures and initials on lines]

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"

Ixtacuixtla, Tlax., 22 de JUNIO de 2022

[Handwritten signature]
DRA. EDELMIRA GARCÍA NIETO
COORDINADORA GENERAL DEL CIESA Y POSGRADO
EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

c.c.p. Expediente



Documento exclusivo para uso de la dependencia responsable o autoridad correspondiente

Agradecimientos

Familiares y amigos

Primero que nada, quiero agradecer a mis padres Mariana León Ramos y Cecilio Silva Almaraz, por el apoyo incondicional durante mi estancia en Tlaxcala, a mis hermanos que me hacen ser mejor persona cada día. Agradezco haber encontrado a personas tan chidas durante mis estudios, entre ellos a Bernardino Romero Nájera y Brígida Moctezuma Saavedra, gracias por el apoyo, los consejos y por brindarme tanto afecto, a la familia Rodríguez Xochicale muchas gracias.

“Lo que importa, no es la cantidad sino la calidad de las personas con los que convives, gracias por todo”

A quienes respeto y admiro mucho.

-Dra. Laura Verónica Hernández Cuevas, gracias por todo el apoyo que he recibido de usted desde la licenciatura, si bien, durante mis estudios de licenciatura no formaba parte de mi comité, me apoyo indistintamente para la redacción de mi tesis, en la maestría siempre se dio el tiempo para atender mis dudas. Ha sido una de las fuentes de inspiración para que quiera continuar por el camino de la investigación, ese amor por lo que hace y la pasión con la que transmite sus conocimientos, algún día espero poder hacerlo también. No fue una docente más, para mi es una amiga, gracias por todos los consejos de aspecto personal, gracias por el apoyo emocional que me brindo, gracias Doc.

-Dra. Alba Mónica Montiel González, gracias por ser mi mamá académica, por todas sus enseñanzas desde que ingrese al laboratorio de biología molecular, por la paciencia que ha tenido conmigo, le agradezco haberme formado como lo hizo, por ser tan objetiva. Gracias por los consejos, fue mi psicóloga en muchas ocasiones, me dio ese apoyo que tanto necesitaba en los momentos complicados de mi vida, agradezco el afecto que me ha brindado y sabe que el sentimiento es mutuo ¡muchas gracias!

-Dr. José Luis Martínez y Pérez, gracias por esas charlas de todo un poco, gracias por el apoyo que me brindo cuando tenía dudas, gracias por la paciencia y los consejos ¡muchas gracias!

-Dr. Saúl Gómez Manzo, quien siempre tuvo la disponibilidad para colaborar en este proyecto, gracias por permitirme realizar algunas pruebas en su laboratorio (INP) y gracias por la donación del reactivo, que me permitió continuar con los experimentos finales (zimogramas), muchas gracias.

-Al biólogo Mario Alberto Hernández Cuapio, quien me apoyó con la edición de la tesis, le agradezco el tiempo y sobre todo sus valiosos comentarios, ya que muchas de las cosas que maneja a la perfección yo las desconocía o ya se me habían olvidado, muchas gracias biólogo.

-Al químico Néstor Gutiérrez Pérez, por su apoyo, lealtad y sobre todo por compartir esa pasión por la química que tiene, por sus comentarios, clases extras y por complicarme la existencia con las fórmulas y cálculos, muchas gracias, gracias por el afecto y esa gran amistad que se forjó durante nuestra formación, porque – así pasa cuando sucede –

-Al doctor Jaime Marcial Quino, quien fue mi asesor de tesis, por su valiosa aportación, muchas gracias. A la Dra. Wendy Argelia García, quien formó parte de mi comité para la obtención del grado, y quien mostró mucha disposición para realizar las observaciones pertinentes, muchas gracias doctora. Así mismo, a la Dra. Arely Anaya Hernández, por sus valiosos comentarios y por apoyarme con el manejo de un programa que yo desconocía ¡muchas gracias por el tiempo!

-Al biólogo Fernando G.O., por el apoyo incondicional, por ser una gran persona en la cual se puede confiar, gracias por tus observaciones y gracias por creer que puedo ser una mejor persona, gracias por el tiempo que me has brindado, muchas gracias.

-A Fany Cano por su amistad incondicional y por hacer que saliera de la rutina, a Jorge Hernández Alonso que siempre me impulso a salir adelante animándome en los momentos difíciles, al maestro Efraín Inzunza Inzunza por sus consejos y por haber compartido conmigo su valiosa experiencia, al maestro Víctor Carrasco Reséndiz† por escucharme y darme tips para la comunicación en público, espero seguir “siempre feliz y de buen humor Selená” fue un gran amigo, nos vemos pronto, a la Sra. Alexandra quien a pesar de las circunstancias siempre estuvo ahí procurando que cuidara mi salud, a la Sra. Victoria y al Sr. Cesario quienes fueron muy atentos cuando llegué al CIGyA, gracias por su apoyo.

- Y, por último, pero no menos importante, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar estudios de maestría, sin la cual no me hubiera sido posible lograrlo.

“Quien no se resuelve a cultivar el hábito de pensar, se pierde el mayor placer de la vida”

Thomas Alba Edison

(1847-1931)

Hoja de financiamiento

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de investigación en Genética y Ambiente (CIGyA), de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), bajo la dirección de la Dra. Alba Mónica Montiel González con financiamiento propio.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	IV
1. Introducción	1
1.1. Generalidades de los hongos.....	3
1.2. Importancia de los hongos saprótrofos en la modificación del ambiente.....	5
1.3. Características y ciclo de vida del Phylum de los basidiomicetos.....	6
1.4. Características generales del orden de los Agaricales y del género <i>Agrocybe</i>	9
1.5. Generalidades del complejo enzimático de los basidiomicetos.....	11
1.6. Características de las enzimas lacasas.....	11
1.7. Funciones fisiológicas de las enzimas lacasas en basidiomicetos	13
1.8. Usos de las enzimas lacasas	13
1.9. Perturbación ambiental y uso de agroquímicos.....	15
1.10. Dinámica del herbicida paraquat en el ambiente	18
1.11. Mecanismo de acción del herbicida paraquat.....	19
2. Antecedentes	21
2.1. Herbicida paraquat	21
2.3. <i>Agrocybe pediades</i> cepa ClGyA-002.....	22
3. Justificación	25
4. Objetivos	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. Metodología	27
5.1. Organismo de estudio	27
5.2. Preselección de la concentración y del momento de adición del paraquat.	27
5.3. Caracterización del crecimiento, consumo de sustrato y actividad enzimática de lacasas extracelulares en <i>A. pediades</i>	29
5.4. Técnicas analíticas	31
5.4.1. Cuantificación de la biomasa	31
5.4.2. Determinación de los cambios de pH	31
5.4.3. Determinación del consumo de sustrato	31
5.4.4. Determinación de la actividad específica extracelular de lacasa.....	32

5.4.5. Análisis estadístico de las muestras	34
5.4.6. Determinación del perfil de lacasas	34
5.4.7. Detección de cambios en la diferenciación morfológica del micelio.....	34
6. RESULTADOS	38
6.1. Toxicidad del herbicida paraquat en la cepa (CIGyA-002) de <i>A. pediades</i>	38
6.1.1. Inhibición del crecimiento de <i>A. pediades</i> por la adición de paraquat al inicio del cultivo	38
6.1.2. Inhibición del crecimiento de <i>A. pediades</i> por la adición de paraquat a las 72 horas del cultivo	41
6.2. Toxicidad de bajas concentraciones de paraquat sobre el crecimiento y caracterización del ECEE de <i>A. pediades</i>	43
6.2.1. Crecimiento de <i>A. pediades</i> en medio con 2 y 5 mg/L de paraquat	43
6.3. Variación del pH durante el tiempo de cultivo	44
6.4. Consumo del sustrato.....	46
6.5. Actividad específica extracelular de lacasas	47
6.6. Perfiles de lacasas.....	50
6.7. Alteraciones en la diferenciación morfológica de las hifas de <i>A. pediades</i> causadas por el paraquat.....	51
7. DISCUSIONES	53
7.1. Efecto tóxico del paraquat en el crecimiento de <i>A. pediades</i>	53
7.2. Alteraciones fisiológicas en <i>A. pediades</i> por la presencia de paraquat	54
7.3. Efectos del paraquat en la excreción de enzimas lacasas de <i>A. pediades</i>	56
7.3.1. Actividad enzimática específica de lacasa.....	54
7.3.2. Perfiles de actividad de lacasas.....	55
7.4. Efecto del paraquat en la morfología de <i>A. pediades</i>	58
8. CONCLUSIONES	61
9. PERSPECTIVAS.....	62
10. LITERATURA CITADA.....	64
11. ANEXOS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la pared celular de hongos.....	4
Figura 2. Hipótesis filogenética para las tres subdivisiones de los basidiomycota.....	6
Figura 3. Formación de las fíbulas.....	7
Figura 4. Ciclo de vida de un basidiomiceto.	9
Figura 5. Morfología de los basidiomas.	10
Figura 6. Representación esquemática del centro activo de la lacasa.	12
Figura 7. Estructura del herbicida paraquat.....	19
Figura 8. Preselección de las concentraciones y adición del herbicida paraquat.....	28
Figura 9. Caracterización del extracto crudo enzimático extracelular de <i>A. pediades</i>	30
Figura 10. Diseño experimental para la observación de hifas de <i>A. pediades</i>	36
Figura 11. Crecimiento de <i>A. pediades</i> a concentraciones de paraquat de 40 a 100 mg/L al inicio del cultivo.....	39
Figura 12. Crecimiento de <i>A. pediades</i> a concentraciones de paraquat de 5 a 20 mg/L al inicio del cultivo	40
Figura 13. Crecimiento de <i>A. pediades</i> a concentraciones de paraquat de 40 a 100 mg/L después de las 72 h.	41
Figura 14. Crecimiento de <i>A. pediades</i> a concentraciones de paraquat de 5 a 20 mg/L después de las 72 h.	42
Figura 15. Crecimiento de <i>A. pediades</i> a 2 y 5 mg/L de paraquat.	44
Figura 16. pH durante el cultivo de <i>A. pediades</i>	45
Figura 17. Consumo de glucosa durante el cultivo de <i>A. pediades</i>	46
Figura 18. Actividad específica extracelular lacasa de <i>A. pediades</i>	48
Figura 19. Coloración del medio de cultivo de <i>A. pediades</i>	48
Figura 20. Perfiles de actividad lacasa de <i>A. pediades</i>	50
Figura 21. Morfología de las hifas de <i>A. pediades</i>	52
Figura 22. Comparación de zimogramas de <i>A. pediades</i>	58
Figura 23. Hifas de <i>A. pediades</i> tratadas con enzimas líticas.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Agrocybe</i> <i>pediades</i>	10.
---	-----

RESUMEN

El paraquat o también llamado comúnmente GRAMOXONE® (sal dicloruro del ion 1,1'-dimetil-4,4' bipyridinio) es un herbicida de contacto no selectivo utilizado ampliamente en la agricultura; por su alta toxicidad, puede alterar los procesos ecológicos entre los que se encuentra el reciclado de los nutrientes, realizado por los hongos saprótrofos. Estos organismos excretan enzimas, como las lacasas, capaces de degradar xenobióticos con estructuras fenólicas, por lo que son de gran interés biotecnológico. Además, se ha sugerido que pueden intervenir en la adaptación de algunas especies fúngicas al estrés térmico y antropogénico. No obstante, y a pesar de producir estas enzimas, dichas condiciones de estrés ponen en riesgo la supervivencia de los hongos incapaces de crecer en presencia de paraquat. Es por ello la importancia de generar información con respecto al daño que este herbicida puede ocasionar en estos organismos.

En el presente estudio se caracterizó el efecto tóxico que el herbicida paraquat ejerce en el crecimiento, la actividad enzimática específica extracelular lacasa, los perfiles de lacasas y las alteraciones en el proceso de diferenciación morfológica en *A. pediades*. Se determinó el efecto de un herbicida comercial que tiene como principio activo al paraquat a concentraciones de 2, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L y en dos momentos de adición del herbicida (inicio del cultivo y a las 72 h), sobre la generación de biomasa. Concluyendo que el paraquat es tóxico para *A. pediades* incluso a las menores concentraciones probadas, independientemente del momento de la adición. Para la determinación de la actividad enzimática se utilizaron cultivos con 2 y 5 mg/L del herbicida. Se determinaron la generación de biomasa, el consumo de sustrato, los cambios de pH en el medio de cultivo, la actividad enzimática específica extracelular y el perfil de lacasas producidas, estas últimas mediante espectrofotometría y zimografía, respectivamente, usando 2,6-dimetoxifenol como sustrato. Las actividades máximas de lacasa obtenidas fueron de 1.671 ± 0.051 UI/mg (144 h), 1.324 ± 0.015 UI/mg (432 h) y 1.511 ± 0.091 UI/mg (360 h), para el control y los tratamientos con 2 mg/L y con 5 mg/L de paraquat, respectivamente. A pesar de que la biomasa en los tratamientos con 2 y

5 mg/L de herbicida fue del 42 y 14 % con respecto a la generada en el control al final del cultivo (432 h), además, se observó que en el tratamiento con 5 mg/L de herbicida la actividad mantuvo su magnitud a partir de las 288 h, hecho distinto a lo que sucedió con los otros tratamientos, lo que indica que el herbicida paraquat no solo está alterando la magnitud de la actividad, sino que también modifica los patrones de excreción de dichas enzimas. En los perfiles de actividad lacasa para todos los tratamientos se observó una banda a la altura del marcador de 75 kDa que se presenta consistente con los datos de actividad enzimática. Este herbicida dañó la pared celular y posiblemente alteró la turgencia natural e intrínseca de las células fúngicas (hinchamiento celular) al observarse desprendimiento de micelio y un incremento en el diámetro de las hifas. Los resultados sugieren que esta cepa tiene potencial para proponerse como un bioindicador de efecto, mientras que los cambios observados en la magnitud y estabilidad de la actividad lacasa podrían retomarse para estudios en el área de biotecnología.

ABSTRACT

Paraquat (ion dichloride salt 1,1'-dimethyl-4,4' bipyridinium) is a non-selective contact herbicide widely used in agriculture; due to its high toxicity, it can alter ecological processes, among which is the recycling of nutrients, carried out by saprotrophic fungi. These organisms excrete enzymes, such as laccases, capable of degrading xenobiotics with phenolic structures, which is why they are of great biotechnological interest. In addition, it has been suggested that they may intervene in the adaptation of some fungal species to thermal and anthropogenic stress. However, despite producing these enzymes, these stress conditions put the survival of fungi incapable of growing in the presence of paraquat at risk. That is why it is important to generate information regarding the damage that this herbicide can cause in these organisms.

In the present study was characterized the toxic effect that the herbicide paraquat exerts on growth, the specific extracellular laccase enzymatic activity, the laccase profiles and alterations in the morphological differentiation process in *A. pediades*. The effect of a commercial herbicide that has paraquat as active ingredient was determined at concentrations of 2, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 and 100 mg/L and at two moments of addition of the herbicide (beginning of the crop and at 72 h), on the generation of biomass. Concluding that paraquat is toxic to *A. pediades* even at lower concentrations tested, regardless of the time of addition. For the determination of the enzymatic activity, were used cultures with 2 and 5 mg/L of the herbicide. The biomass generated, substrate consumption, changes in the pH of the culture medium, specific extracellular enzyme activity and the profile of laccase produced were determined, these last, by spectrophotometry and zymography, respectively, using 2,6-dimethoxyphenol as substrate. The maximum activities of laccase obtained were 1.671 ± 0.051 IU/mg (144 h), 1.324 ± 0.015 IU/mg (432 h) and 1.511 ± 0.091 IU/mg (360 h), for the control, with 2 mg/ L and with 5 mg/L of paraquat, respectively. Despite the fact that the biomass in the treatments added with 2 and 5 mg/L of herbicide was 42 and 14% with respect to that generated in the control at the end of the culture (432 h). In addition, it was observed that in the treatment with

5 mg/L of herbicide, the activity maintained its magnitude after 288 h of cultivation, a fact different from what happened with the other treatments, which indicates that the paraquat herbicide is not only altering the magnitude of the activity, but also modifies the excretion patterns of the enzymes. In the laccase activity profiles for all treatments, a band was observed at the height of the 75 kDa marker, which is consistent with the enzymatic activity data. This herbicide damaged the cell wall and possibly altered the natural and intrinsic turgidity of the fungal cells (cellular swelling) by observing mycelial detachment and an increase in the diameter of the hyphae. The results suggest that this strain has the potential to be proposed as a bioindicator, while the changes observed in the magnitude and stability of laccase activity could be taken up for studies in the area of biotechnological studies.

1. Introducción

Los hongos se caracterizan por desarrollarse en cualquier lugar donde existan otros seres vivos, los hongos terrestres más antiguos datan de aproximadamente 1200-1600 millones de años (Feijóo-Vivas *et al.*, 2021). Existe una gran variedad de formas y de estilos de vida en los hongos, aunque al mismo tiempo se conocen algunos que no han sufrido cambios morfológicos drásticos a lo largo del tiempo —a esto se le conoce como estasis evolutiva—, como es el caso de muchos hongos micorrízicos (Galindo-Flores *et al.*, 2015). No obstante, ambas circunstancias, los hongos han evolucionado a través de la historia, gracias a la selección natural y a los mecanismos adaptativos que han experimentado en términos fisiológicos y morfológicos, que han favorecido su sobrevivencia ante diferentes condiciones ambientales (Méndez y Navarro, 2014). Lo anterior, habla de la gran gama de estrategias que poseen para enfrentar esos cambios, razón por la que se considera que pueden sobrevivir incluso a la contaminación por diversos compuestos xenobióticos (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006; Hernández *et al.*, 2013).

Los hongos saprótrofos son los principales descomponedores de la materia orgánica (Cuevas, 2016). Proceso en el que participan las plantas de manera muy importante, puesto que producen biopolímeros complejos difíciles de degradar (lignina, celulosa y hemicelulosa, principalmente) por organismos, que no cuentan con el conjunto de enzimas característico de los hongos saprótrofos, conformado por peroxidasas y lacasas, capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono. Los hongos saprótrofos preparan las condiciones para que otros organismos puedan colonizar diferentes sitios, al descomponer tales materiales y hacerlos biodisponibles (Cuevas, 2016). Actualmente, las mayores presiones selectivas son ocasionadas por el ser humano, que ejercen acciones con efectos negativos para la naturaleza, entre las que predominan el cambio de uso de suelo, la erosión y la deforestación, que modifican las características físicas, químicas y biológicas de los ecosistemas (Andrews y Harris, 2007). Lo que ha ocasionado que varios grupos de hongos desaparezcan o se vuelvan resistentes a condiciones

particulares, determinadas por la cantidad y la magnitud de los cambios ocasionados en el ambiente (Zulueta, 2007).

A pesar de la concepción que se tiene de los hongos saprótrofos, como resistentes a cualquier condición ambiental, existen especies que pueden ser directamente afectadas por las alteraciones ocasionadas por las actividades humanas (Martín-Mex *et al.*, 2017). En el caso del cambio de uso de suelo y en la deforestación, que tienen como fin aumentar las zonas de producción agropecuaria, se enfrentan además a la presencia de numerosos compuestos químicos que se aplican para erradicar organismos indeseables o plaga que ocasionan pérdidas en la producción agrícola (González *et al.*, 2010). Estos productos son capaces de afectar negativamente a organismos no blanco como es el caso del herbicida paraquat (López, 2005).

El paraquat es un compuesto químico que se utiliza en México también llamado comúnmente GRAMOXONE®. Se caracteriza por no ser selectivo con la biota, debido a que el mecanismo de acción descrito para controlar la proliferación de plantas indeseables consiste en la generación de radicales libres que ocasionan estrés oxidativo y la muerte de los individuos (Gowan® México, 2021). Sin embargo, no se ha descrito cómo el paraquat podría afectar al crecimiento y a la actividad enzimática de los hongos del género *Agrocybe*, degradadores de materia orgánica que se encuentran en el suelo, con mecanismos de adaptación tan diversos que pueden incluir la acción detoxificante por enzimas fenoloxidasas (enzimas con actividad lacasa). Debido a esto, es creciente el interés por determinar el daño que este herbicida podría provocar en los hongos colonizadores habituales de los bosques perturbados por la actividad agrícola, que incluye el uso común de agroquímicos. Por estas razones, en el presente estudio se caracterizó el efecto tóxico que el herbicida paraquat ejerce sobre el crecimiento vegetativo de *Agrocybe pediades*, un hongo saprótrofo que habita un bosque de *Juniperus deppeana* (sabino) en el estado de Tlaxcala, considerado como perturbado por incendios forestales y por la influencia de las actividades agrícolas cercanas al bosque

(Ortega, 2018). Así mismo, se determinaron los cambios en la actividad enzimática de las lacasas extracelulares dependientes de la concentración del paraquat, con la finalidad de conocer las posibles implicaciones que tales cambios puedan tener sobre la función ecológica del hongo, en pro de la conservación de esta especie y su posible uso como bioindicador de los efectos del herbicida estudiado.

Dentro de la información relevante para soportar el presente planteamiento, la referente a las características intrínsecas de los hongos, así como aquella que describe las interacciones que sostiene con su ambiente son fundamentales y se tratarán a continuación.

1.1. Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos que se alimentan de materia orgánica vegetal o animal, misma que utilizan como fuente de carbono y de energía (Santiago *et al.*, 2013). Están conformados por un complejo celular llamado micelio, constituido por hifas, que son células alargadas; aunque algunos pueden ser unicelulares y estar integrados por células globosas o subglobosas, como es el caso de las levaduras (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014).

Las hifas son células filamentosas que se desarrollan a través del crecimiento de uno de sus extremos, crecen y se ramifican sucesivamente, para generar un sistema radial llamado micelio; las hifas y los micelios caracterizan a la mayoría de los hongos y los hacen aptos para un estilo de vida que se ha especializado en la descomposición y en la absorción de materia orgánica (Santiago *et al.*, 2013; Kuhar *et al.*, 2013). Los micelios confieren a los hongos una gran capacidad de sobrevivencia, al permitir un crecimiento indeterminado y continuo, siempre que las condiciones así lo permitan; aprovechan eficientemente los recursos cuando estos son escasos en las áreas adyacentes al hongo (Rojas, 2013; Santiago *et al.*, 2013; Kuhar *et al.*, 2013). Las hifas, al ser muy delgadas, pueden penetrar con facilidad diferentes sustratos, así mismo, el daño provocado por depredación o rompimiento físico puede ser atenuado al afectar sólo una parte del organismo, propiciando la

formación de septos que aíslan el contenido en zonas no afectadas (micelio tabicado). La muerte o senescencia del micelio puede darse de manera local sin impactar el desarrollo de todo el organismo, por ello, los hongos pueden cubrir grandes áreas y tener cientos de años (Rojas, 2013; Santiago *et al.*, 2013; Kuhar *et al.*, 2013).

Ambos, micelios y levaduras, poseen membrana y pared celular fundamentales para el buen funcionamiento de la célula (**Fig. 1**) (Arenas, 2014). En la membrana de los hongos se encuentra la enzima quitina sintetasa involucrada en la formación de quitina, principal biopolímero que constituye su pared celular (Arenas, 2014). La pared celular es la principal barrera de defensa de los hongos, ya que posee un gran número de receptores que, tras su activación, desencadenan cascadas complejas de señalización en el interior de las células (Morris y Villmann, 2006; Pontón, 2008). Esta estructura es esencial para los hongos; la ruptura, la eliminación o los defectos en su formación tienen consecuencias graves en la célula, llegando a causar la muerte por lisis (Heitman, 2005).

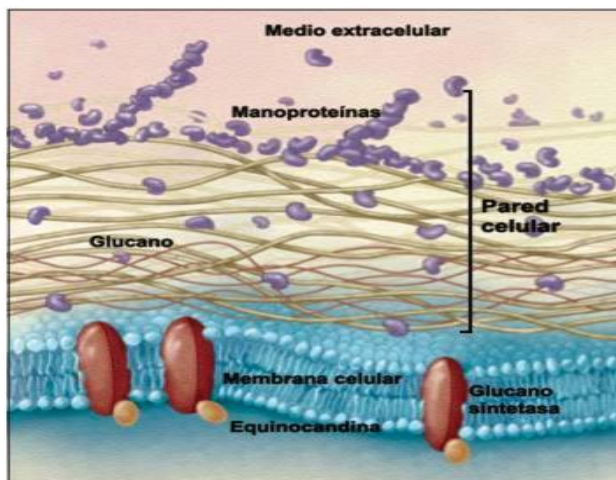


Figura 1. Estructura de la pared celular de hongos susceptibles a Equinocandinas. Tomado de Bennett, J. E. 2016.

Gracias a la pared y membrana celulares, algunos hongos tienen la capacidad de tolerar el estrés oxidativo ocasionado por la generación de radicales libres, hecho relacionado con la eficiencia en la producción de quitina, y continuar con su función ecológica, así como con el modelamiento del ambiente (Vinícius *et al.* 2013). Se

consideran organismos ubiquistas (se adaptan a medios ecológicos diferentes) porque están presentes en diferentes ambientes, no obstante, los grupos fúngicos que predominan en ellos dependen de las características de adaptación que posee cada gremio funcional (Santiago *et al.*, 2013).

1.2. Importancia de los hongos saprótrofos en la modificación del ambiente

Los hongos son organismos que habitan en todos los ecosistemas terrestres o acuáticos, coexistimos con ellos y sus acciones transforman el entorno en que vivimos, como es el caso de los hongos saprótrofos (Bonkowski *et al.*, 2000; Paz, 2011), que son aquellos que se nutren de material orgánico en procesos de descomposición; ya sean exudados vegetales, productos de excreción, excrementos de animales, restos vegetales y restos de animales (Santiago *et al.*, 2013; Schwartzberg, 2019). Este grupo juega un papel muy importante en el reciclaje de nutrientes reincorporando carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, potasio y otros microelementos atrapados en la materia orgánica, a los ciclos biogeoquímicos, para que otros organismos puedan utilizarlos (Álvarez, 2005).

Existen hongos saprótrofos que solo se alimentan de los exudados de las raíces y de las hojas, otros que poseen un eficiente complejo enzimático capaz de degradar fuentes de carbono complejas como el almidón, la celulosa y la lignina (Santiago *et al.*, 2013). Estas dos últimas formadas en grandes cantidades anualmente por las plantas y consideradas como los materiales más recalcitrantes de la naturaleza, de tal forma que la vida en el planeta se vería amenazada sin la acción de los hongos saprótrofos que son los principales encargados de su degradación (González, *et al.*, 2006). Estos hongos no solo mineralizan las sustancias orgánicas, también actúan como reservorios acumulándolas en el micelio y posteriormente, liberándolas gradualmente para que las plantas puedan utilizarlas, función esencial en la nutrición vegetal y en el equilibrio de los ecosistemas, modificando el ambiente para que la vida en la Tierra siga teniendo éxito (Santiago *et al.*, 2013).

En la naturaleza, diversos grupos de hongos tienen la capacidad de degradar parcialmente la lignina, sin embargo, los basidiomicetos son los hongos capaces de degradarla hasta su mineralización completa, es decir, hasta la producción de dióxido de carbono y de agua (Pointing, 2001).

1.3. Características y ciclo de vida del Phylum de los basidiomicetos

El Phylum Basidiomycota se ha clasificado con tres subdivisiones (**Fig. 2**): Subdivisión Ustilaginomycotina: carbonos y grupos afines; Pucciniomycotina: royas y grupos similares, y Agaricomycotina: hongos con himenio (Bauer *et al.*, 2006).

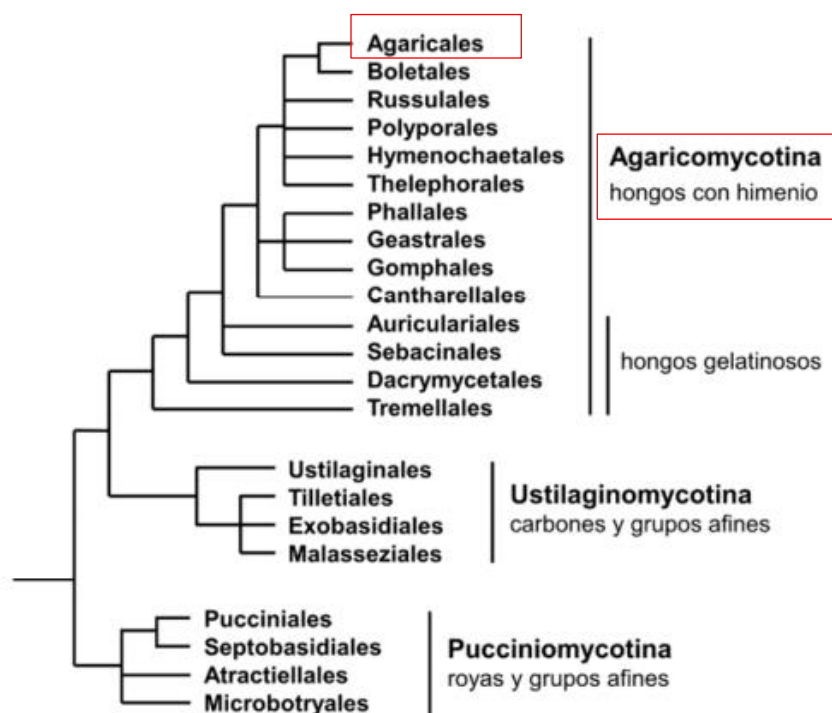


Figura 2. Hipótesis filogenética para las tres subdivisiones de los basidiomycota. Tomado de Piepenbring, 2015.

Este phylum se caracteriza por el basidio, un meiosporangio en el que generalmente se forman cuatro esporas sexuales con un apículo, aunque existen excepciones (Bauer *et al.*, 2006), en la mayoría de los casos se forma un esporoma o cuerpo fructífero. En las hifas típicamente se forman septos con doliporos y fíbulas; tienen una dicariofase extendida; el micelio somático puede reproducirse de forma sexual

(teleomorfo) y asexual por somatogamia (sólo fusión de hifas somáticas) y a través de la formación de conidios (anamorfo) (Webster y Weber, 2007; Salazar-Vidal, 2019b).

Los basidiomicetos tienen la particularidad de formar fíbulas (**Fig. 3**), estructuras que cumplen la función de separar los núcleos y coordinar su división durante el ciclo celular, para la formación de micelio heterocariótico (Piepenbring, 2015; Salazar-Vidal, 2019b). Existen varias características microscópicas que los distinguen de otras divisiones, como es el caso de los cistidios, que corresponden a hifas terminales que presentan diferenciación en su estructura y función, pero en contraste con los basidios, son estériles; cumplen funciones como el mantenimiento de la humedad para la maduración de las esporas, la separación de las láminas o la secreción de sustancias; también pueden presentar distinta morfología, tamaño y ubicación, particulares para cada especie o género (Webster y Weber, 2007; Salazar-Vidal, 2019a).

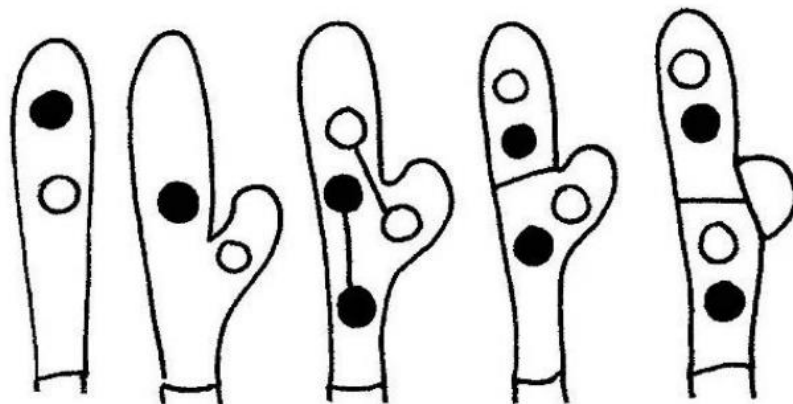


Figura 3. Formación de las fíbulas. Tomado de Salazar-Vidal, 2016.

Por lo general, el micelio vegetativo se desarrolla en el suelo y sobre restos de plantas o de animales muertos, estrategia que ha permitido a los hongos ser tan diversos y colonizar prácticamente todos los ambientes de la Tierra (Santiago *et al.*, 2013). Los basidiomicetos pueden reproducirse asexual o sexualmente; el primer tipo de reproducción se caracteriza por no formar órganos especializados y no conlleva a una fusión nuclear (mitosis); como resultado de este tipo de reproducción se obtiene un gran número de individuos y la etapa de crecimiento ocurre en forma repetitiva (Piepenbring, 2015; Salazar-Vidal, 2019a) sin

proporcionar variabilidad genética como sucede en el tipo sexual, pues se lleva a cabo por medio de esporas vegetativas, sin embargo, es más rápida y puede darse por fragmentación de micelio, ya que poseen la capacidad de regenerarse y de formar otro individuo o clon (Webster y Weber, 2007). En el tipo de reproducción sexual (**Fig. 4**), hay formación de órganos especializados y conlleva a la fusión de núcleos compatibles, es decir, a la recombinación genética (existe un intercambio de genes); este tipo de reproducción consta básicamente de tres etapas: la plasmogamia (fusión de protoplastos), la cariogamia (unión de núcleos) y la meiosis (Webster y Weber, 2007; Salazar-Vidal, 2019a).

Cuando los hongos basidiomicetes son de carácter heterotálico, el micelio primario sufre una dicariorización (somatogamia o espermatización) produciendo hifas dicarióticas que corresponden al micelio secundario, por otro lado, están los hongos homotálicos en donde una basidiospora produce el micelio dicariótico (Salazar-Vidal, 2019a)

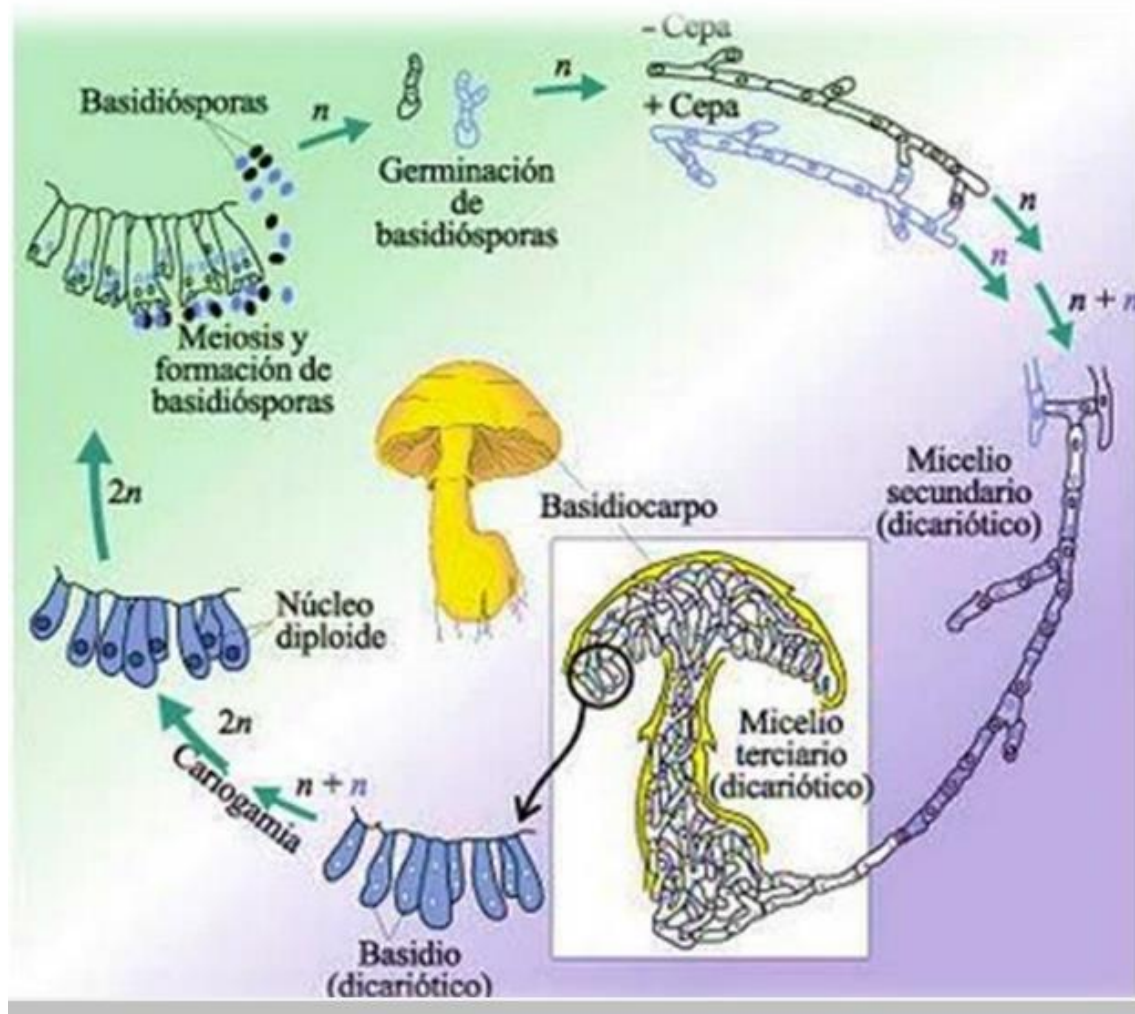


Figura 4. Ciclo de vida de un basidiomiceto. Tomado de Salazar-Vidal, 2016.

1.4. Características generales del orden de los Agaricales y del género *Agrocybe*

El Orden de los Agaricales se caracteriza por ser un grupo monofilético (morfológicamente) al tener un estípite separable del píleo, es decir, están bien diferenciados; forman láminas libres y carne fibrosa y el color de las esporas puede ir de blanco a púrpura-negruzco (Picón, 2007; Pardavé *et al.*, 2012). En este orden podemos encontrar al género *Agrocybe*; es relevante mencionar que los análisis filogenéticos moleculares han sugerido que el género es polifilético (Walther y Wei, 2006; Tóth *et al.*, 2013; Halama, 2016).

Los hongos del género *Agrocybe* forman esporoma o cuerpo fructífero y laminillas, pueden tener o no velo parcial o anillos y poseen esporas color marrón opaco (Halama, 2016); son de hábitos saprótrofos, por lo general, se desarrollan a una temperatura de 25 °C, aunque pueden hacerlo en un intervalo entre 15 a 40 °C, el pH más favorable para su crecimiento es de 5.6 (Estrada y Ramírez, 2019). Pueden encontrarse en hojarasca, madera, raramente en el estiércol y varias especies pertenecientes a este género son comestibles, una de ellas es *Agrocybe pediades*; esta especie se ha encontrado en campos de hierba, prados y pastizales (**Tabla 1** y **Fig. 5**) (Acharya *et al.*, 2017; Ortega, 2018), con una distribución conocida en España, Argentina y México (Moreno *et al.*, 2010; Coimbra, 2015).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Agrocybe pediades*

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Orden	Agaricales
Familia	Strophariaceae
Género	<i>Agrocybe</i>
Especie	<i>A. pediades</i>



Figura 5. Morfología de los basidiomas (A y B) de la cepa (CIGyA-002) *Agrocybe pediades*. Tomado de Ortega, 2018.

1.5. Generalidades del complejo enzimático de los basidiomicetos

Las hifas excretan enzimas extracelulares que degradan los compuestos que existen en su entorno, debido a que su forma de nutrición es por absorción; las enzimas no solo son proteínas que actúan como descomponedoras de los sustratos biológicos, sino que todas las reacciones químicas del metabolismo celular se realizan gracias a su acción catalizadora (Li *et al.*, 2010). Dentro del complejo enzimático de los basidiomicetos se encuentran las enzimas lignino y manganeso peroxidasa, y las enzimas lacasas (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxígeno oxidorreductasa) o también llamadas oxidasas multicobre (Yoshida, 1883). Estas enzimas tienen la capacidad de oxidar sustratos fenólicos, anilínicos y tioles aromáticos, utilizando como último aceptor de electrones al oxígeno, el cual es reducido a H₂O (Thurston, 1994). No requieren de H₂O₂ para completar su ciclo redox y esto las convierte en una opción prometedora para los procesos de detoxificación enzimática de materiales ligninocelulósicos y de algunos otros compuestos xenobióticos con estructuras similares a la lignina, por lo que muchas especies de hongos saprótrofos son consideradas tolerantes a contaminantes de tipo ligninocelulósicos y afines (Rodríguez y Toca, 2007).

1.6. Características de las enzimas lacasas

Las enzimas lacasas son glicoproteínas (Barragán-Huerta *et al.*, 2015) que pueden ser monoméricas, diméricas o tetraméricas, contienen cuatro átomos de cobre (Cu²⁺) por monómero y un centro activo altamente conservado (Levin *et al.*, 2012). Este centro activo, se subdivide en tres tipos (**Fig. 6**) dando lugar a las lacasas azules tipo 1, con una absorción electrónica en la banda cercana a los 600 nm, debido a la estructura trigonal que se forma por la posición de un átomo de cobre ligado a dos histidinas, una cisteína y una metionina. Las lacasas de tipo 2, el átomo de cobre se encuentra ligado a dos histidinas y es típico de los iones cobre en complejos tetragonales (Rodríguez, 2006). Las lacasas amarillas tipo 3, se absorben a 330 nm, debido a que presenta dos átomos de cobre coordinados con

tres histidinas cada uno y un puente hidroxilo el cual mantiene unidos a los átomos de cobre (Solomon *et al.*, 1993).

Dependiendo de las propiedades electrónicas de los tres centros activos, las lacasas se pueden dividir en dos grupos, lacasas de alto potencial redox, como las que sintetizan los hongos y lacasas de bajo potencial redox, generalmente secretadas por bacterias y plantas (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006; Mikolasch y Schauer, 2009).

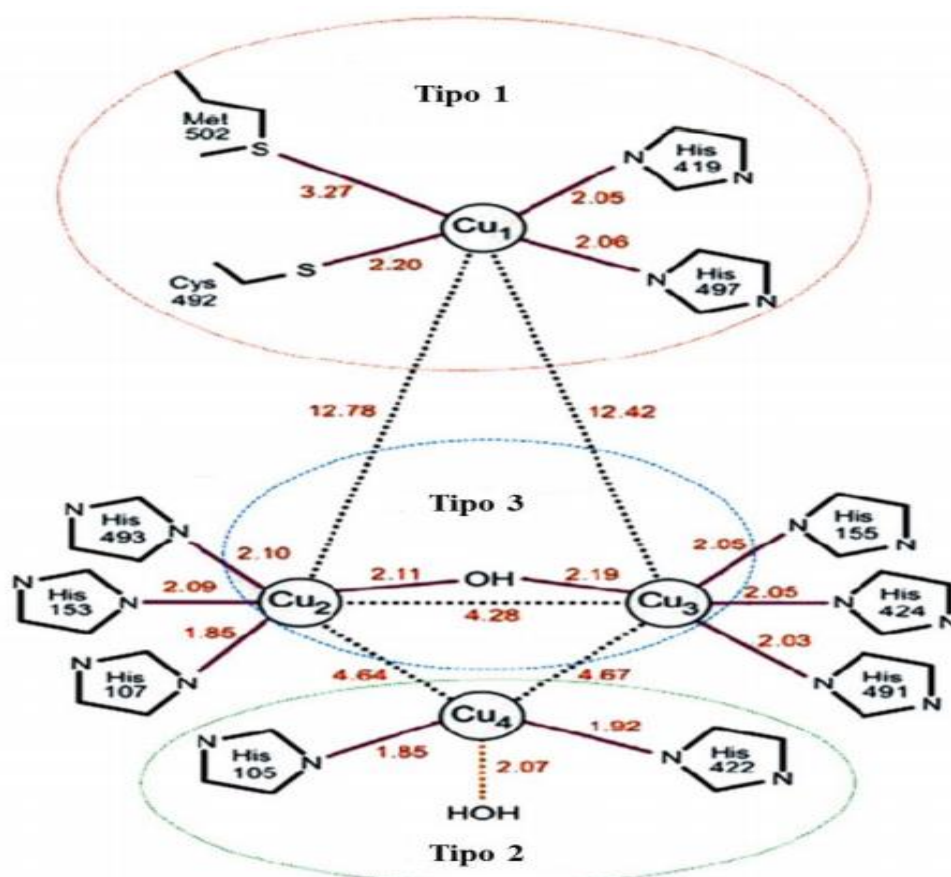


Figura 6. Representación esquemática del centro activo de la lacasa. Tomado de Dwivendi *et al.*, 2011.

Las lacasas catalizan la sustracción de un electrón del grupo hidroxilo del compuesto fenólico formando sus correspondientes radicales fenoxilo, los cuales forman compuestos de mayor peso molecular mediante un mecanismo de polimerización oxidativa (Ghoul y Chebil, 2012). Aunque las lacasas no pueden actuar sobre los compuestos no fenólicos y compuestos fenólicos de elevado

potencial redox, se ha observado que en presencia de diferentes mediadores naturales como ciertos fenoles del prehidrolizado, las lacasas pueden terminar por oxidarlos (Cañas y Camarero, 2010; Oliva, 2017).

1.7. Funciones fisiológicas de las enzimas lacasas en basidiomicetos

Generalmente, los basidiomicetos secretan lacasa a partir del micelio vegetativo, se incrementa su síntesis durante la fructificación y disminuye con la maduración del esporoma; en el caso de *Lentinula edodes* las enzimas lacasas participan en la síntesis de melanina (Nagai *et al.*, 2003); en el género *Pleurotus* participan en el crecimiento vegetativo (Armas *et al.*, 2019), están involucradas en la formación de pigmentos (Thurston, 1994) y esporas, en procesos de detoxificación y de patogénesis (García *et al.*, 2012); mientras que en el hongo *A. pediades* cepa CIGyA-002 se sugiere que dichas enzimas están involucradas en los procesos de adaptación a estrés térmico, ya que la expresión de enzimas intra y extracelulares varía en función de la temperatura de cultivo (Silva-León, 2019), lo que sugiere el desarrollo de estrategias adaptativas en el hongo mediante la excreción de enzimas lacasas, al no estar dirigidas solo a la degradación para compuestos complejos para su alimentación.

1.8. Usos de las enzimas lacasas

Además de la participación fisiológica que tienen las lacasas en los hongos que las producen, su estudio ha sido de interés como elementos capaces de realizar reacciones de catálisis, para la obtención de productos útiles en las diferentes industrias, de tal manera que los factores que impactan su expresión *in vivo* pueden ser, simultáneamente, considerados para la mejora de proceso de interés humano. Las lacasas ofrecen diversas ventajas que son de gran interés para su aplicación biotecnológica (Baldrian, 2006) al oxidar tanto compuestos tóxicos para la biota (Violeta 51 y azul 81), como no tóxicos pero recalcitrantes (lignina, celulosa y

hemicelulosa); son poco específicas y ecológicamente sostenibles (Shraddha *et al.*, 2011).

Las lacasas son utilizadas en procesos de biopulpeo para separar y eliminar la lignina de la celulosa en la industria papelera (Deleé *et al.*, 1988), se usan para blanquear fibras y sintetizar colorantes para la industria textil (Desai y Nityanand, 2011); para catalizar reacciones de transferencia de electrones sin la adición de cofactores para el área de la nanobiotecnología y como biosensores para detectar compuestos fenólicos y oxígeno (Rodríguez y Toca, 2007). Se han utilizado para la eliminación de fenoles indeseables en jugos y para mejorar las características sensoriales de los productos de la industria alimentaria (Shraddha *et al.*, 2011), también se desarrollan tintes capilares a base de lacasas que sustituyen al peróxido de hidrógeno como agente oxidante para la industria cosmética (Rodríguez y Toca, 2007). En el área de recuperación de ambientes contaminados se aplica para la degradación de plásticos que contienen unidades de olefina (Kunamneni *et al.*, 2006), para la degradación de poliuretanos, para la decoloración de aguas residuales de molinos de aceite de oliva y en los molinos de pulpa, donde remueven fenoles colorantes (Kunamneni *et al.*, 2006; Ruiz, *et al.*, 2018). En la biorremediación de suelos las lacasas oxidan contaminantes orgánicos tóxicos y otros xenobióticos (Castillejos, 2015). El uso de las enzimas lacasas inmovilizadas sobre soportes orgánicos, permite la remoción natural de los xenobióticos aromáticos en suspensiones acuosas de irrigación (Minussi *et al.*, 2002; Paredes-Juárez *et al.*, 2017). Por todo ello, el potencial catalítico de las lacasas sugiere una posibilidad para la recuperación de ambientes perturbados que impliquen la presencia de compuestos tóxicos con estructura similar a la lignina, siempre y cuando la integridad fisiológica del hongo sea sostenible.

1.9. Perturbación ambiental y uso de agroquímicos

Las perturbaciones naturales son eventos que ocurren de manera relativamente discreta en el tiempo y el espacio, modifican el estado físico o la estructura de la población, de la comunidad o del ecosistema, reiniciando procesos de regeneración y sucesión (Pickett y White, 1985; Manson *et al.*, 2009). El efecto de las perturbaciones en la dinámica de los ecosistemas ha sido observado como algo negativo, sin embargo, numerosas investigaciones han rechazado esa idea y han dado lugar a un cambio de paradigma en la ecología; la concepción de que los ecosistemas naturales son dinámicos, se modifican continuamente, presentan cambios complejos, pueden estar en diferentes estados cercanos o no a la estabilidad y las perturbaciones naturales tienen un papel importante en su funcionamiento (Terradas, 2001; Gunderson y Holling, 2002). Las perturbaciones han actuado como fuerzas selectivas de los procesos evolutivos que promueven la diversidad biológica y como parte de los procesos ecológicos que mantienen o generan patrones de variación espacial y temporal en la diversidad de ecosistemas, de especies y de poblaciones (Foster, 2000; Brawn, 2001), pudiendo ser frecuentes y pequeñas o infrecuentes y grandes (Connell, 1979; Manson *et al.*, 2009). Las perturbaciones frecuentes y pequeñas generan parches de hábitats en distintas etapas de desarrollo de sucesiones (Reice, 2001), crean la heterogeneidad necesaria para conservar la biodiversidad (White y Jentsch, 2001). Las perturbaciones infrecuentes y grandes son eventos aislados en grandes extensiones, del orden de cientos o de miles de hectáreas (es lo que sucede, por ejemplo, con los huracanes más intensos, las erupciones volcánicas o los grandes incendios de bosques) (Romme, *et al.* 1998; Manson *et al.*, 2009). Esto permite reiniciar el desarrollo de un ecosistema con el tiempo necesario para que se establezca (Batista y Platt, 2003).

Las perturbaciones que influyen en los ecosistemas pueden ser originadas también por intervención del hombre, al reconvertir los bosques para fines productivos o al contaminar los cuerpos de agua y los suelos, en un intento por eliminar los residuos originados durante los procesos humanos, pudiendo modificar o amplificar los efectos de eventos naturales y alterar regímenes históricos de perturbación en un

ecosistema particular aumentando su vulnerabilidad. Debido a que son distintos a cualquier otro factor que en el pasado influyera en los patrones y en los procesos de los ecosistemas o en la evolución y adaptación de la biota, ocasionando grandes pérdidas de biodiversidad; este tipo de perturbaciones son las que han dañado más severamente a los ecosistemas, por la extracción de recursos y por el uso extensivo e intensivo de compuestos xenobióticos que limitan o incluso evitan que los diferentes elementos que integran a los ecosistemas puedan regenerarse (McNeill, 2000; Power, 2009). La importancia de realizar estudios que muestren los efectos que diferentes contaminantes ejercen sobre los organismos vivos es que permitirán dimensionar las pérdidas y concebir la magnitud de los problemas que en el mediano y largo plazo la humanidad tendrá que enfrentar.

La contaminación ambiental es provocada por la actividad antropogénica que se caracteriza por el empleo de una gran cantidad de compuestos xenobióticos, entre ellos los contaminantes emergentes, como los productos para el cuidado personal, aditivos de las gasolinas e industriales, antisépticos, fármacos, surfactantes y plaguicidas; el destino final de estas sustancias depende de sus propiedades fisicoquímicas, no obstante, han sido encontradas en todos los tipos de ambientes (Toro-Restrepo, 2011; García *et al.*, 2017).

Históricamente, los plaguicidas pueden considerarse como de los más antiguos al ser utilizados con el propósito de obtener altos rendimientos en la agricultura moderna, lo que ocasiona una alta demanda en el uso de una amplia variedad de agroquímicos (González *et al.*, 2010). En México, más del 45 % de los plaguicidas comercializados son herbicidas, de los cuales el más empleado es el paraquat (Hernández y Martínez, 2006; González y Hansen, 2009).

El paraquat (sal dicloruro del ion 1,1'-dimetil-4,4' bipiridinio) es un herbicida de contacto no selectivo y uno de los más usados para el control de malezas de hoja ancha y de pastos (Della, 2004); fue introducido a México en el año 1969 y continúa usándose hasta hoy, a pesar de su alta toxicidad en humanos, sugerida por

investigaciones de los últimos años, que indican que este herbicida podría estar relacionado con padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson (Dinis *et al.*, 2006; Berry *et al.*, 2010). En las áreas agrícolas, los herbicidas afectan la calidad del suelo, por lo que su aplicación ha sido cuestionada para alcanzar el manejo sustentable de los agroecosistemas (Soto *et al.* 2009); debido a que la persistencia y la acumulación de estas sustancias en la matriz edáfica podría ejercer también efectos negativos sobre los organismos no blanco, como los hongos y bacterias sensibles al contacto con xenobióticos (Saeki y Toyota, 2004; Sebiomo *et al.*, 2011).

La conservación de la microbiota edáfica es fundamental para mantener la fertilidad y la productividad de los suelos, dada su participación en el reciclaje de nutrientes mediante la descomposición de los restos vegetales (Manson *et al.*, 2009) y la supresión de importantes fitopatógenos, a través de la producción de fitohormonas y de enzimas capaces de degradar algunos compuestos tóxicos (Chan *et al.*, 2014). Sin embargo, la presencia de compuestos con mecanismos de toxicidad más generalizada, no permite la adaptación de muchas especies del suelo; en el caso de los hongos, el grado de susceptibilidad a los herbicidas está relacionado con su capacidad para degradar y mantener concentraciones bajas del contaminante en el micelio, lo que no siempre puede darse por hecho cuando el tóxico daña alguna de las vías vitales de respiración del organismo, situación que incide directamente en el mantenimiento no solo de los ecosistemas, sino de los organismos y de las funciones que los integran (Berry *et al.*, 2010)

1.10. Dinámica del herbicida paraquat en el ambiente

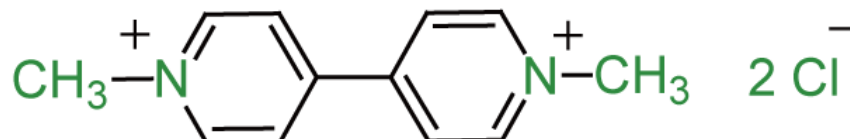
La manera más común de aplicar este herbicida es mediante la aspersión, incluso es utilizado en agua para controlar malezas acuáticas (Della, 2004), puede lixiviarse por su alta capacidad de dilución en agua y puede ser adsorbido por los sedimentos o el material en suspensión, en este último caso, al descomponerse los tejidos es liberado y fijado al sedimento; no se ha encontrado suspendido en el aire bajo condiciones normales de uso (Gowan® México, 2021).

En la matriz edáfica este herbicida es fuertemente adsorbido por los constituyentes del suelo, los coloides y la materia orgánica, lo que reduce su biodisponibilidad para las plantas, las lombrices de tierra y los microorganismos, sin embargo, por estar inmóvil en los suelos resulta muy persistente (valores de persistencia o tiempo de vida media residual mayores a 1000 días) y puede ser transportado por escorrentía junto con el sedimento; bajo condiciones de campo, el residuo es redistribuido lentamente, registrándose valores de degradación en el suelo de 5-10 % por año (Madeley, 2002).

El paraquat ha sido prohibido en países de la Unión Europea, debido al alto grado de toxicidad que posee confirmado por experimentos en laboratorio (Castillo, 2007), en México fue restringido en 1991 (Catalogo Oficial de Plaguicidas, 1991) sin embargo, se sigue utilizando de forma irregular y no se ha podido prohibir debido a que no hay estudios suficientes para sustentar que ocasiona riesgos para la biota a diferentes niveles y a diferentes especies (Agenda de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), 2020). El paraquat no solo es utilizado en la agricultura, la Secretaría de la Defensa Nacional (SEDENA) lo usa para erradicar hectáreas de cultivos ilegales como marihuana y amapola (Castillo, 2007), sin evaluar los riesgos ambientales que su uso representa.

1.11. Mecanismo de acción del herbicida paraquat

El paraquat (**Fig. 7**) es un reactivo que promueve la generación de radicales libres (FR) tales como el anión superóxido O_2^- y el altamente reactivo hidroxilo $OH^\cdot$ que reacciona con casi cualquier clase de molécula orgánica (TECNOAGRICOLA, 2021).



del H_2O_2 (León-Verastegui, 2012; Agenda de Protección Ambiental de Estados Unidos [EPA], 2020).

Otros antioxidantes no enzimáticos, como el glutatión, el ascorbato, los carotenoides, los flavonoides, el tocoferol, los ácidos ureico y lipoico, varios aminoácidos, poliaminas y una variedad de compuestos fenólicos también cumplen un papel importante en la red de antioxidantes que protegen a las células vegetales (Calderón y Serpa, 2003; Blokhina *et al.* 2003).

Este herbicida tiene un potencial de reducción similar al de las reacciones de transferencia de electrones asociadas al fotosistema I, donde inhibe el proceso fotosintético interfiriendo en la reacción de Hill, en el flujo de electrones en el fotosistema I ó II; en especies tolerantes resultan reducidos e interviene en el aparato fotosintético, donde la luz y el oxígeno forman un radical libre, provocando un rompimiento de las membranas del cloroplasto (Blokhina *et al.*, 2003).

Es uno de los herbicidas de contacto más utilizado debido a que causan una rápida desecación del follaje, seguida de necrosis; el paraquat no inhibe el transporte de electrones en el fotosistema II, sino que se los quita a la ferredoxina provocando su reducción y la liberación de radicales libres y, por ende, la peroxidación de las membranas (Blokhina *et al.*, 2003; Orozco, 2021).

Son pocos los estudios enfocados a determinar la toxicidad de herbicidas con mecanismos de toxicidad similares al del paraquat en especies de hongos saprótrofos, así como las modificaciones que causa sobre la producción y la actividad de enzimas relacionadas con su función ecológica.

2. Antecedentes

2.1. Herbicida paraquat

Algunos estudios que se basan en la hipótesis de que los hongos saprótrofos son capaces de degradar una amplia gama de compuestos xenobióticos tóxicos y se ha tratado de definir cuáles de las enzimas de sus complejos extracelulares son las responsables de este hecho.

Jaszek *et al.* (2006) utilizaron las cepas de *Trametes versicolor* y *Abortiporus biennis* pertenecientes a los hongos Basidiomycetes de podredumbre blanca y evaluaron los efectos del paraquat sobre las actividades lacasa, manganeso peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa. El paraquat fue añadido a los 10 días de cultivo en medio mineral líquido a concentraciones de 20 M y 25 M para *A. biennis* y *T. versicolor*, respectivamente. Los tratamientos fueron incubados a 25 °C en oscuridad. Los resultados de este estudio muestran que el paraquat estimuló significativamente la actividad lacasa en comparación con el control, por otro lado, el análisis del gel de PAGE nativo, demostró que *A. biennis* y *T. versicolor* no excretaron nuevas isoformas de lacasa en presencia del estrés causado por el paraquat. Además, el aumento de la actividad lacasa estuvo relacionado con la pérdida de peso seco y observaron una actividad mejorada de la superóxido dismutasa extracelular en ambas cepas, durante las primeras 48 h después de la aplicación del paraquat. Aunado a ello, el paraquat provocó un aumento evidente de las enzimas catalasas y el agotamiento del glutatión en los micelios de *T. versicolor* y *A. biennis*.

Por otro lado, los estudios realizados por Camacho-Morales *et al.* (2017) evaluaron la degradación de paraquat y la actividad enzimática extracelular de manganeso peroxidasas (MnP), lignino peroxidasas (LiP) y lacasas, provenientes de ocho cepas de las especies: *Polyporus tricholoma* (ECS-58; ECS-64), *Cylindrobasidium laeve* (ECS 91), *Phellinus gilvus* (ECS-61), *Grifola frondosa* (ECS-703), *Gymnopus barbipes* (ECS-85), *Deconica citrispora* (ECS-77) y *Cyathus olla* (ECS-86), todas pertenecientes a los hongos de la podredumbre blanca.

Estas cepas se incubaron en medio con paraquat durante 12 días a 28 °C. Los autores observaron que las cepas de *P. tricholoma* ECS-58 (32,3 %) y *D. citrispora* ECS-77 (47,6 %) producían un mayor porcentaje de degradación de dicho herbicida con respecto a las otras cepas. Además, presentaron los valores más altos de actividad enzimática de lacasas y de MnP. Así mismo, determinaron el porcentaje de inhibición del crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de paraquat grado reactivo (50, 150, 250, 350, 450 y 550 mg/L). De la misma manera, dos cepas (*D. citrispora* ECS-77 y *C. laeve* ECS-91) crecieron en presencia de 50 mg/L de paraquat y mostraron porcentajes de inhibición de 86 y 35.8 %, respectivamente. Esto sugiere que las enzimas constituyentes del sistema ligninolítico son específicas de cada especie; algunos hongos de pudrición blanca degradan selectivamente la lignina. Por lo tanto, estas especies carecen de una o de más enzimas ligninolíticas. Por otro lado, los autores atribuyen la tasa de síntesis y de secreción de las enzimas extracelulares a los niveles limitados de carbono o de nitrógeno, como factores que influyeron en los resultados. El incremento en la actividad enzimática extracelular de MnP y de lacasa, sugiere que estas enzimas están relacionadas con respuestas que ocasiona el paraquat en la célula fúngica.

2.3. *Agrocybe pediades* cepa CIGyA-002

El Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Genética y Ambiente se cuenta con una colección de cepas de hongos saprótrofos entre las que se encuentra la cepa CIGyA-002 de *A. pediades*. Esta cepa se colectó de un ecosistema perturbado por actividad antropogénica, como pastoreo, cambio de uso de suelo e incendios forestales. Se identificó por medio de análisis moleculares del basidioma (tomado del ejemplar colectado) y del micelio cultivado *in vitro* utilizando la región ITS para el análisis de similitud de secuencias con las depositadas en bases de datos mundiales mediante el programa de búsqueda de alineamiento local BLAST (por sus siglas en inglés). Igualmente, se realizó la caracterización macro y microscópica de los basidiomas y se utilizaron claves taxonómicas (Ortega, 2018).

Torres (2017) determinó la producción de enzimas características de los hongos saprótrofos (MnP, LiP y lacasas) en la cepa CIGyA-002 de *A. pediades* y en la cepa OAR006 de *Gymnopus* sp., que fueron aisladas de un bosque de *Juniperus deppeana*. En ese estudio, *A. pediades* (CIGyA-002) mostró actividad de manganeso peroxidasa y de lacasa, esta última en al menos tres isoenzimas utilizando como sustrato 2,6 dimetoxifenol (DMP) 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 mM y pH 6.5.

Silva-León (2019) analizó el crecimiento de esta cepa a diferentes temperaturas de cultivo (15, 20, 27 y 30 °C) en EMA durante 360 h, los resultados de este estudio indicaron que la cepa de *A. pediades* a 30 °C, presenta mayor crecimiento con una velocidad media de 7.701 ± 0.538 mm/día. En este estudio también se cuantificó la actividad enzimática específica lacasa tanto intra como extracelular, y se realizaron zimogramas utilizando como sustrato DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 mM y pH 6.5, observándose que en el hongo incubado a 30 °C la actividad enzimática específica lacasa extracelular fue mayor a las 216 horas (352.155 ± 23.412 UI/L), mientras que la actividad de lacasa intracelular fue mayor a los 15 días de incubación (1533.098 ± 36.375 UI/L). En los zimogramas se observaron dos bandas con actividad lacasa: en el extracto intracelular se observó una de 50 kDa aproximadamente y en el extracto extracelular, una de 100 kDa con respecto al marcador de peso molecular. Estas enzimas, particularmente en *A. pediades*, pueden estar involucradas en el desarrollo y adaptación del hongo como un mecanismo que le permite hacer frente al estrés térmico, ya que el perfil de enzimas lacasas es diferente a distintas temperaturas y en los extractos intra y extracelulares (Silva-León, 2019). Hernández (2021) analizó la capacidad que tiene *A. pediades* para tolerar y crecer en presencia de hexaclorobenceno (HCB) y como resultados obtuvo que esta cepa tolera concentraciones de 10 hasta 500 µg/L de HCB en medio líquido, concluyendo que la presencia de HCB no causó efecto adverso en el crecimiento de *A. pediades*. La tolerancia al HCB puede sugerir que la cepa CIGyA-002 al provenir de un ambiente perturbado, pudo en su hábitat, estar en contacto con algunos compuestos químicos como los herbicidas y expresar

mecanismos enzimáticos para responder a este agente de presión ambiental. Sin embargo, el mecanismo de toxicidad del HCB es distinto al del paraquat, que puede estar jugando un papel muy importante como agente selectivo en esta cepa, impidiendo el crecimiento celular debido a la presencia de radicales libres. Por otro lado, Sánchez (2021) sometió el micelio de *A. pediades* a tratamiento enzimático para provocar la lisis de la pared celular y obtener protoplastos, concluyendo que *A. pediades* es altamente sensible a este tratamiento y se observaron modificaciones morfológicas en las hifas (ensanchamientos y fragmentación).

La revisión de la literatura sugiere que, hasta la fecha, no se conoce el efecto que tienen los herbicidas con mecanismos de generación de radicales libres, como el paraquat, sobre aspectos fisiológicos de *A. pediades*, tampoco se han evaluado los cambios en la actividad de enzimas extracelulares involucradas en la degradación de la materia orgánica, información que daría indicios acerca de la forma en la que la afectación por el herbicida pudiera alterar las funciones ecológicas de la especie.

3. Justificación

Los cambios en la diversidad de especies en los ecosistemas, causados por actividades antropogénicas como el uso intensivo y extensivo de compuestos químicos que se vierten constantemente al ambiente y que afectan a todas las matrices ambientales, hacen necesario ampliar el conocimiento sobre tales afectaciones, incluso en hongos como los saprótrofos, que aunque poseen gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes aún se desconoce mucho sobre los cambios en la producción del complejo enzimático que les permite degradar xenobióticos.

Este trabajo pretende generar información con respecto al riesgo ambiental latente sobre la biodiversidad microbiana del suelo, de seguir utilizando compuestos tóxicos no selectivos como el paraquat como coadyuvantes en la práctica agrícola, tomando como eje de estudio a una especie de hongos saprótrofos, grupo funcional considerado clave para el mantenimiento de los ecosistemas. La especie seleccionada es *A. pediades* (CIGyA-002), para aportar datos sobre los posibles cambios en el crecimiento, en la actividad y en los patrones de producción de enzimas extracelulares lacasas, características de su complejo enzimático utilizado para el reciclaje del carbono y a las cuales algunos autores han atribuido participación en procesos de adaptación a cambios ambientales. Aunado a ello, este trabajo aportará información sobre el uso potencial de la especie en el área de biorremediación y como posible bioindicador. Con esto, se podría complementar el conocimiento existente y contribuir a la toma de decisiones en cuanto al uso de paraquat en México.

Las principales incógnitas que se desean responder están encaminadas a conocer cuál es el efecto de diferentes concentraciones de paraquat, administradas en diferentes momentos del cultivo, sobre el crecimiento *in vitro* de *A. pediades* en medio líquido; a determinar de qué manera el paraquat modifica la actividad de enzimas extracelulares con actividad lacasa y su perfil de producción en esta especie, y finalmente, conocer el efecto que tiene el paraquat en la diferenciación morfológica de *A. pediades*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar los efectos tóxicos que el paraquat ejerce sobre el crecimiento, el consumo de sustrato, la actividad enzimática específica extracelular de lacasas, el perfil de las lacasas y la diferenciación morfológica en *A. pediades* cultivado en medio líquido.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el crecimiento de *A. pediades* en función de la concentración y el momento de adición del paraquat al cultivo, mediante la cuantificación de la biomasa para la evaluación de la toxicidad.
2. Analizar las alteraciones fisiológicas de *A. pediades* manifestadas como cambios en el pH del cultivo y el consumo de sustrato, relacionados con el metabolismo fúngico.
3. Determinar los cambios en la producción de lacasas causados por el paraquat en *A. pediades*, utilizando 2,6-dimetoxifenol como sustrato para la cuantificación y el perfil de la actividad enzimática de lacasas extracelulares.
4. Describir cualitativamente las modificaciones que sufre el micelio de *A. pediades* como consecuencia de la adición del paraquat en el cultivo, a través del estudio microscópico de las características morfológicas de las hifas.

5. Metodología

5.1. Organismo de estudio

Se utilizó la cepa ClGyA-002 de *Agrocybe pediades*. Este es un basidiomiceto saprótrofo aislado de un bosque de *Juniperus deppeana* (sabino) ubicado en el municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, Tlaxcala (Ortega, 2018). Este hongo cuenta con un registro en la colección de microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CM-CNRG 700).

La cepa se propagó en cajas de Petri con 30 mL de medio agar-extracto de malta (EMA), a partir del micelio activo (periferia de la zona de crecimiento) y fue incubado en oscuridad a 25 °C. Después de tres días las placas se invirtieron hasta la colonización completa de la caja de Petri. Las placas se mantuvieron a 4 °C para la posterior propagación y la obtención de las siguientes generaciones del hongo.

Se utilizó EMA como medio de propagación y la incubación se realizó durante 360 h, posteriormente se utilizó la tercera generación como inóculo para todos los tratamientos en los cultivos en medio líquido.

5.2. Preselección de la concentración y del momento de adición del paraquat.

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL, con 30 mL de medio mineral mínimo (MM) con glucosa y extracto de levadura, como fuentes de carbono y de nitrógeno (ver anexo) (Rojas, 2010).

Se probaron diferentes concentraciones de paraquat en dos etapas, la primera fue con las concentraciones de 0, 40, 60, 80 y 100 mg/L y la segunda con 0, 5, 10, 15, 20 mg/L, para ambas etapas se vertió el paraquat al inicio y a las 72 h de cultivo, estimando 100 mg/L como la concentración mínima inhibitoria de este compuesto de acuerdo con las concentraciones probadas en hongos saprótrofos de pudrición blanca por Camacho-Morales *et al.* (2017). Las concentraciones se calcularon a partir de la fórmula comercial de paraquat (GRAMOXONE® marca Syngenta),

que contiene 25% de ingrediente activo (sal dicloruro del ion 1,1'-dimetil-4,4' bipiridinio) y 75 % de coadyuvantes (diluyente (agua), humectante y estabilizante) que promueven la efectividad para la eliminación de hierbas (Intrakam, 2007; Gramoxone®, 2022).

Cada concentración de paraquat probada constituyó un tratamiento, teniendo como tratamiento control al cultivo sin herbicida (**Fig. 8**). Para determinar el efecto tóxico del paraquat a diferentes tiempos de adición al cultivo, se probó la adición desde el inicio y a las 72 h. Para el primer experimento se agregaron las concentraciones correspondientes a las unidades experimentales antes de la inoculación. Posteriormente, fueron inoculadas con cinco cilindros de agar de 9.45 mm de diámetro colonizados con micelio de *A. pediades*. Los matraces fueron incubados a 30 °C en una incubadora con agitación orbital (Prendo INO 650 V-11) a 100 rpm (Silva-León, 2019) durante 216 h y cada 72 h se tomaron las muestras por triplicado. Para el segundo experimento, la adición de las diferentes concentraciones de herbicida se realizó después de las 72 h de crecimiento del hongo. La adición fue realizada en una campana de flujo laminar (VECO), la solución de paraquat fue esterilizada por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.22 µm. La incubación de los matraces y el muestreo fueron realizados en las condiciones antes descritas.

El crecimiento se evaluó por medio de la generación de biomasa, estimado mediante el método de peso seco. El diseño experimental fue de bloques completos al azar.

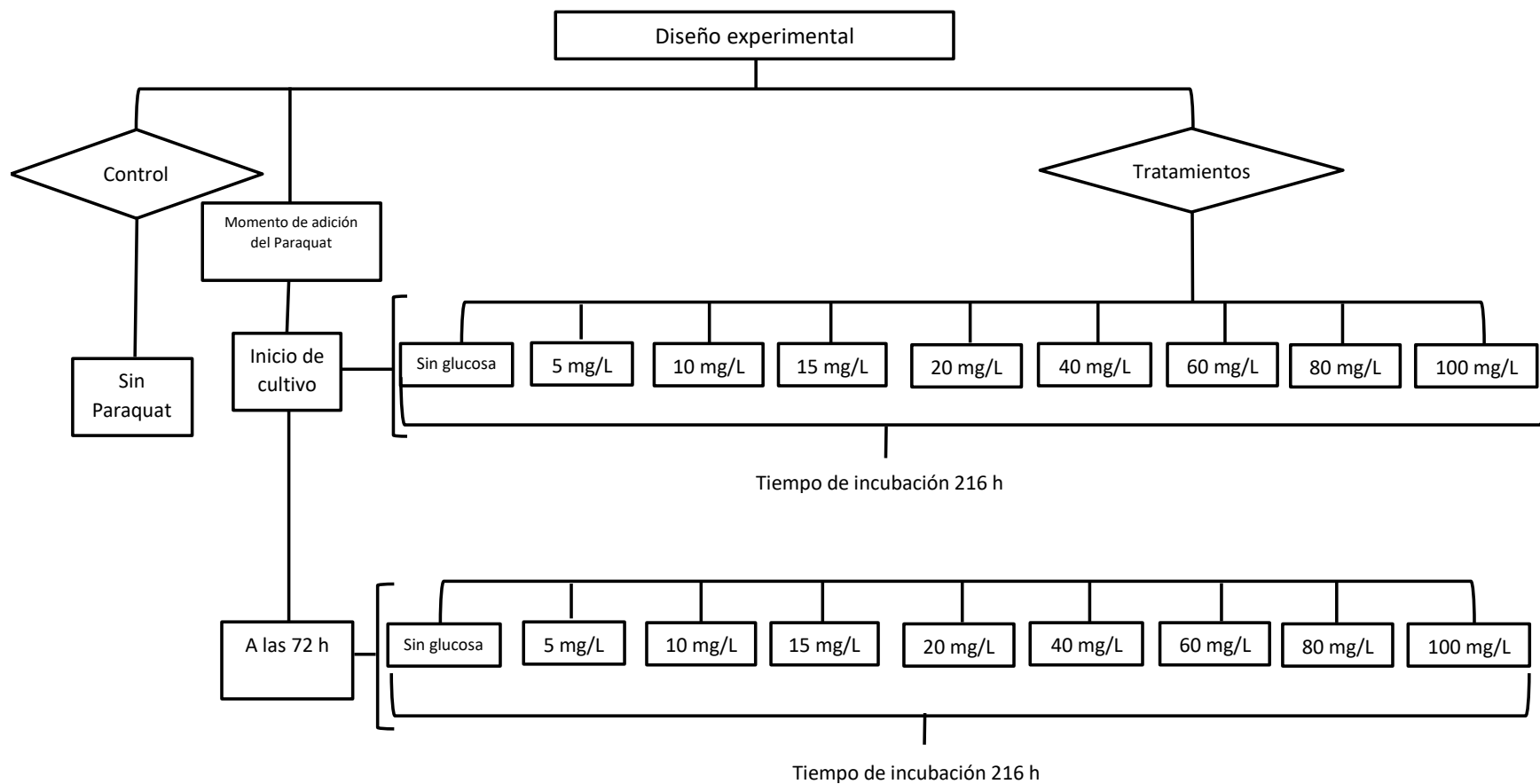


Figura 8. La preselección de las concentraciones y adición del herbicida paraquat se realizó en dos etapas, en la primera se utilizaron las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L y en la segunda las concentraciones de 5, 10, 15 y 20 mg/L de paraquat, el muestreo se realizó cada 72 h por triplicado para todos los tratamientos, evaluando biomasa como variable de respuesta.

Para cada unidad experimental, la biomasa se obtuvo filtrando el contenido de los matraces del cultivo colocando un embudo Buchner con papel filtro Whatmnan No.1, previamente puesto a peso constante, en un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío (Millipore). Obtenida la biomasa en el papel filtro, las muestras se dejaron en un horno de secado (Drying Oven FCD- 3000 serials) durante tres días a 45 °C hasta peso constante. Transcurrido este tiempo, el papel con la biomasa se pesó en una balanza analítica (Denver Instruments) y se registró la diferencia de peso.

5.3. Caracterización del crecimiento, consumo de sustrato y actividad enzimática de lacasas extracelulares en *A. pediades*

Para la caracterización de los cultivos considerando la producción de lacasas se probaron dos tratamientos; concentraciones bajas de paraquat (2 y 5 mg/L) (**Fig. 9**) que permiten el crecimiento del hongo, con su respectivo control (sin herbicida). Las unidades experimentales fueron inoculadas con micelio de la tercera generación. Se utilizó MM con la composición anteriormente descrita. Cada matraz contenía 50 mL de medio inoculado con cinco cilindros de agar de 9.16 mm de diámetro con micelio, se incubó en oscuridad a 30 °C y 100 rpm durante 432 h, con tres réplicas. La adición de paraquat se realizó a las 72 h y el muestreo fue cada 72 h. El diseño experimental fue de un factor completamente al azar.

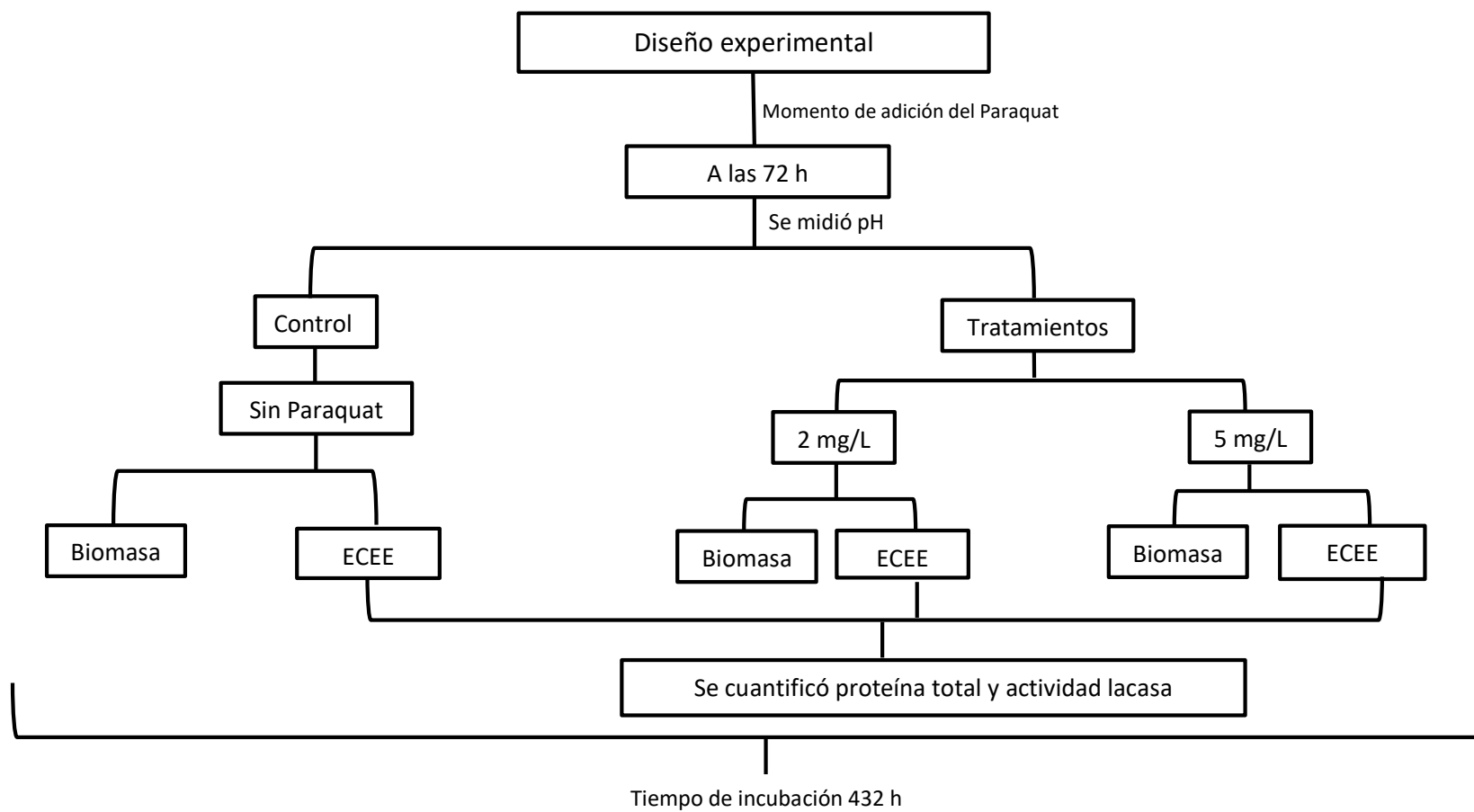


Figura 9. Caracterización del extracto crudo enzimático extracelular (ECEE) de *A. pediades*, el muestreo se realizó cada 72 h por triplicado para todos los tratamientos. Cada matraz fue muestreado al azar para cada tiempo analizado.

5.4. Técnicas analíticas

5.4.1. Cuantificación de la biomasa

La biomasa de cada unidad experimental se obtuvo por filtración del medio con micelio al vacío, con papel filtro Watman No. 1 a peso constante; la cuantificación se realizó por el método de peso seco, siguiendo el procedimiento antes descrito. El extracto resultante de la filtración constituye el extracto extracelular crudo enzimático (ECEE) que será utilizado para la caracterización de aspectos fisiológicos del crecimiento (pH y consumo de sustrato), así como de la producción y actividad enzimática lacasa.

5.4.2. Determinación de los cambios de pH

A los extractos resultantes en la etapa de filtrado, inmediatamente después de ser obtenidos, se les midió el pH mediante un equipo de potenciometría (OAKTON® pH 700).

5.4.3. Determinación del consumo de sustrato

Para determinar el consumo de glucosa en los extractos se cuantificó la glucosa residual con el método de azúcares reductores utilizando el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Se construyó una curva estándar a una concentración final de 1.2 g/L de glucosa. El reactivo DNS se preparó disolviendo 0.8 g de NaOH en agua destilada, posteriormente se agregaron 15 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado y 0.5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), esta mezcla se aforó a 50 mL con agua destilada, una vez disuelto se filtró y se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C. La mezcla de reacción se realizó en tubos Eppendorf de 2 mL con 0.5 mL de la muestra (o solución de glucosa con concentración conocida) y 0.5 mL del reactivo DNS, se llevaron a ebullición en un

termo-bloque (ACCUBLOCK TM-Labnet) durante 5 minutos, e inmediatamente se detuvo la reacción con un baño de agua con hielo.

La mezcla de cada muestra fue transferida a tubos de ensayo de 15 mL y se agregaron 5 mL de agua destilada para reconstruir las muestras, se agitaron, se dejaron en reposo durante 15 minutos y se determinó la absorbancia a 540 nm (Ávila *et al.*, 2012). El mismo tratamiento se usó para el blanco que consistió en medio sin glucosa. En cada muestra para la curva patrón y para el ECEE (previamente diluida) se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (JENWAY 6715 UV/Vis Spectrophotometer) a una longitud de onda de 540 nm. A partir de las lecturas de absorbancia para cada concentración de glucosa de la curva patrón se obtuvo una ecuación de la recta para el posterior cálculo de concentración de glucosa residual en las muestras. El sustrato inicial fue de 5 g/L (glucosa), al cual se le restaron los resultados obtenidos de azúcares reductores calculados anteriormente para cada muestra, de esta forma se obtuvo el consumo de glucosa para su posterior análisis. El ECEE restante, se conservó en tubos Falcon de 50 mL a -20 °C para la cuantificación de actividad lacasa extracelular.

5.4.4. Determinación de la actividad específica extracelular de lacasa

La cuantificación de actividad extracelular lacasa se midió por espectrofotometría a través del cambio de absorbancia de la luz derivada de la oxidación del DMP utilizado como sustrato, con un espectrofotómetro (JENWAY 6715 UV/Vis Spectrophotometer). La actividad se expresó en unidades internacionales (UI), donde 1 UI es definida como la actividad de la enzima que cataliza la transformación de 1 μ mol de sustrato en producto por minuto (Sharma *et al.*, 2016). Se utilizó un blanco de calibración cuya mezcla contenía 200 μ L de agua y 800 μ L de DMP 2 mM en buffer de fosfatos (0.1 M, pH de 6.5). La mezcla de reacción se realizó sustituyendo los 200 μ L de agua por el extracto (ECEE) más la adición de los 800 μ L de DMP, obteniendo un volumen final de reacción de 1 mL. Se incubó durante cuatro minutos a 39 °C y la lectura de absorbancia se realizó a 468 nm. Para el uso

de la fórmula se consideró el coeficiente de extinción molar del DMP que es de $49.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sharma *et al.*, 2016).

Los valores de actividad lacasa representan las unidades de actividad en un volumen de cultivo o de diluyentes sin indicar la proporción de proteína que representa con respecto a la proteína total soluble producida por el hongo. Para conocer el rendimiento de las enzimas extracelulares con actividad lacasa producida en los tratamientos, se calculó la actividad enzimática extracelular específica (Sharma *et al.*, 2016). Para ello se realizó la cuantificación de la proteína total soluble en cada una de las muestras por el método de Lowry *et al.* (1951).

Se utilizó un volumen de 200 μL del extracto crudo enzimático extracelular (ECEE) al cual se le agregó 1 mL del reactivo de Lowry, la mezcla se agitó en un vórtex y se incubó durante 15 minutos a 25°C , después se adicionaron 100 μL del reactivo Folin-Cicalteau; se agitó nuevamente en el vórtex y se incubó durante 30 min a 25°C . Una vez terminados los 30 min de incubación se procedió a leer la muestra en el espectrofotómetro obteniendo los valores de absorbancia a 750 nm. El blanco consistió en 200 μL de agua destilada estéril, 1 mL del reactivo de Lowry, 100 μL del reactivo Folin-Cicalteau, y fue procesado como las demás muestras. Así mismo, se realizó la curva patrón, empleando distintas concentraciones de albúmina bovina diluida en agua destilada con el procedimiento antes descrito. Para calcular la actividad específica lacasa se utilizó la siguiente fórmula:

$$A = \frac{m}{\varepsilon * \text{proteína}}$$

Dónde:

A: Actividad enzimática específica lacasa (UI/mg).

m: Es el cambio de absorbancia con respecto al tiempo en minutos.

ε : Coeficiente de extinción molar (2,6-dimetoxifenol es de $0.0496 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

proteína: Cantidad de proteína total en mg en la reacción.

5.4.5. Análisis estadístico de las muestras

Se realizó la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y posteriormente un análisis de varianza (ANOVA de un factor) para determinar si existen diferencias significativas en los parámetros medidos entre los tratamientos, utilizando un valor de confianza del $p < 0.05$. Para conocer en qué grupos existen diferencias significativas se realizó una prueba *post hoc* de Tukey. Estos análisis fueron procesados en el programa estadístico SPSS Statistics 25 (IBM® SPSS® Statistics, 2017) y los gráficos se realizaron en el programa ORIGIN (ORIGIN®2021).

5.4.6. Determinación del perfil de lacasas

El perfil de enzimas extracelulares con actividad lacasa producidas en los cultivos de *A. pediades*, se realizó por zimografía. La electroforesis de proteínas se hizo en geles de poliacrilamida por el método SDS-PAGE modificado bajo condiciones semi-desnaturalizantes (sin β -Mercaptoetanol) con la finalidad de conservar la actividad enzimática para realizar los zimogramas. Se utilizó acrilamida al 4% para el gel de empaquetamiento y al 11 % para el gel de corrimiento, en geles delgados de 0.75 mm; se utilizó el marcador de peso molecular “Precision plus protein™ standards” (BioRad). Para cada muestra se cargaron 23 μ L de ECEE que contenían de 0.2 a 0.3 μ g de proteína por pozo. La electroforesis se corrió a 150 V por 1-1.30 h (Téllez-Téllez *et al.*, 2005). Posteriormente, los geles se lavaron con agua desionizada durante 1 - 1.5 h, cambiando el agua cada 15 min para retirar el SDS y renaturalizar las proteínas. Para revelar las bandas se utilizó como sustrato DMP 2 mM en buffer de fosfatos (0.1 mM, pH 6.5).

5.4.7. Detección de los cambios en la diferenciación morfológica del micelio

Se realizó la inoculación con la tercera generación de la cepa original en el medio, como se describe en la sección 5.3. El muestreo se realizó al final del cultivo (432 h) para cada tratamiento, por triplicado (**Fig. 10**).

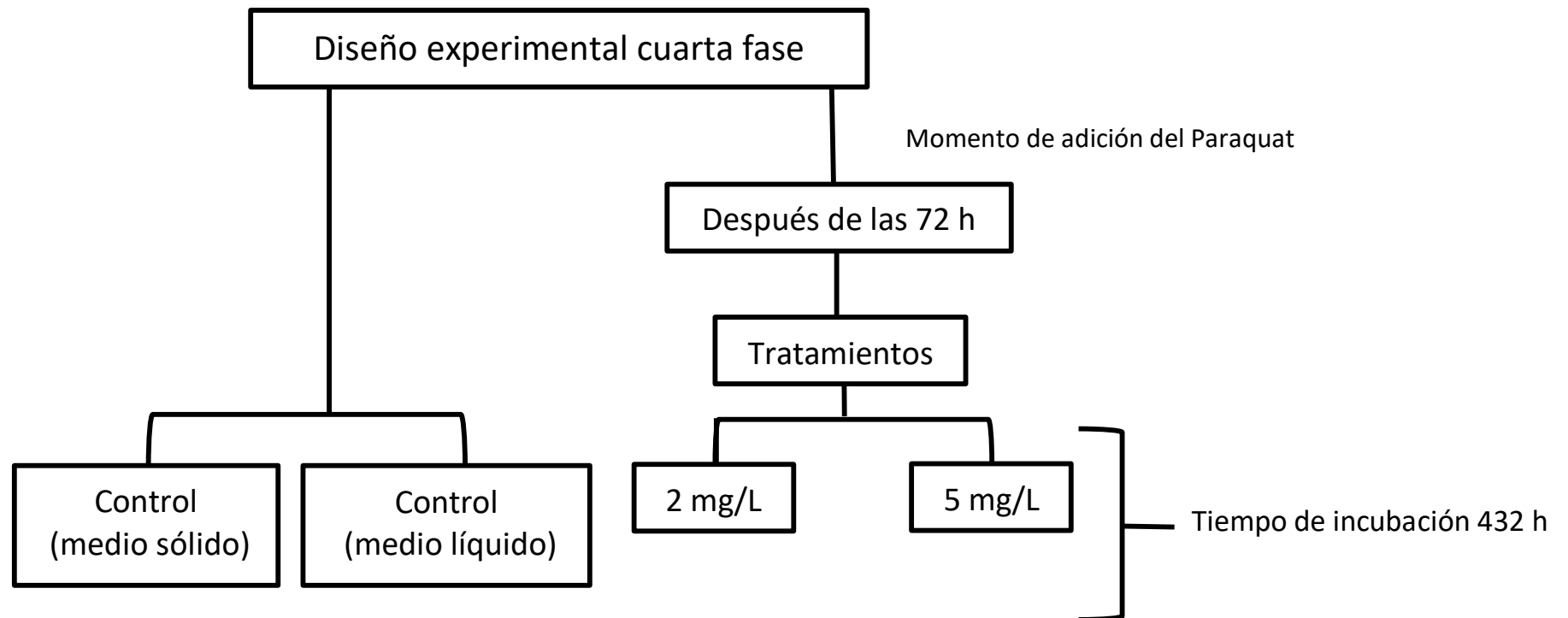


Figura 10. Diseño experimental para la observación de hifas de *A. pediades*. Las muestras se tomaron al final del cultivo (432 h), cada tratamiento se realizó por triplicado. De cada réplica se obtuvieron 12 laminillas teñidas con azul de algodón en lactofenol.

Para describir la morfología del micelio en presencia de paraquat, fue necesario observar a diferentes aumentos, con alta nitidez y contraste con ayuda de azul algodón en lactofenol para mejorar las observaciones. Los compuestos químicos contenidos en el colorante permiten la tinción diferencial de las paredes fúngicas (González *et al.*, 2011).

Para la preparación del colorante se utilizaron 10 g de fenol cristal y se disolvieron en 10 mL de agua desionizada estéril, posteriormente, se agregaron 10 mL de ácido láctico y 10 mL de glicerina, la mezcla se calentó a 70 °C y se adicionaron 0.025 g de colorante (azul de lactofenol), se mezcló muy bien y se filtró empleando papel filtro Whatman No. 1 estéril con ayuda de una bomba de vacío (Millipore).

Las muestras se tomaron de la zona centro, de la zona intermedia y de la zona periférica de crecimiento del micelio de *A. pediades*, con la finalidad de obtener información de los cambios morfológicos de las hifas durante su crecimiento y determinar si el daño causado por paraquat depende de la madurez del micelio. Posteriormente, se colocaron las muestras en portaobjetos y se agregó una gota de azul de lactofenol, se colocó el cubreobjetos y una vez preparada la muestra se observó al microscopio óptico (LEICA DM750) con objetivos 10X, 40X y 100X, para medir el diámetro de las hifas se utilizó el programa ImageJ (2021).

6. RESULTADOS

6.1. Toxicidad del herbicida paraquat en la cepa (CIGyA-002) de *A. pediades*

6.1.1. Inhibición del crecimiento de *A. pediades* por la adición de paraquat al inicio del cultivo

Los resultados obtenidos dan evidencia de que el herbicida paraquat es tóxico para la cepa CIGyA-002 de *A. pediades* a las concentraciones probadas. Se analizó la cantidad de biomasa generada en cada tiempo de muestreo para cada tratamiento probado con la finalidad de registrar la biomasa máxima y posteriormente, se compararon las cantidades correspondientes a cada tiempo entre los tratamientos para determinar sus diferencias. El análisis estadístico (ANOVA) indica que existen diferencias significativas en la generación de biomasa máxima del hongo en cada tratamiento ($F=307.624$, $p < 0.0003$) y en el análisis *post hoc*, la biomasa máxima del tratamiento sin glucosa fue aparentemente mayor (0.547 ± 0.075 g/L) que la generada por los tratamientos con paraquat (40, 60, 80 y 100 mg/L), el control generó mayor cantidad de biomasa en todos los tiempos de muestreo que los tratamientos con paraquat y sin glucosa, alcanzando una biomasa máxima de 2.35 ± 0.116 g/L a las 216 h. La cantidad de biomasa máxima disminuye en todos los tratamientos con herbicida, con valores que van de 0.503 g/L a 0.557 g/L con respecto al control y al tratamiento sin glucosa (**Fig. 11**).

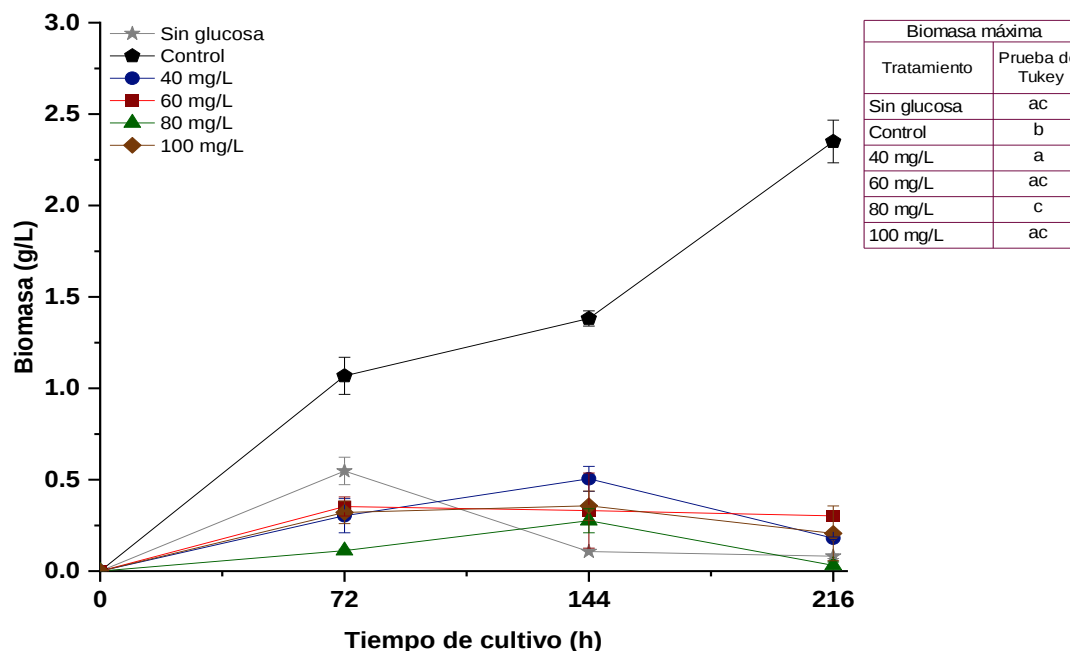


Figura 11. Crecimiento de *A. pediculus* en cultivo líquido con adición de paraquat desde el inicio del cultivo. Cada punto representa el promedio $\pm$ SD de tres réplicas. En la tabla de la derecha se muestran los resultados de la prueba de Tukey para la biomasa máxima, letras diferentes significa que existen diferencias significativas $p < 0.05$.

En una segunda etapa, se disminuyeron las concentraciones de paraquat (5, 10, 15 y 20 mg/L) y mostraron que existen diferencias significativas entre las medias de la biomasa máxima generada en cada tratamiento ($F = 366.026$, $p < 0.0001$). El tratamiento sin glucosa generó aparentemente mayor cantidad de biomasa máxima (0.678 ± 0.013 g/L) que los tratamientos con paraquat a excepción de la concentración de 5 mg/L de paraquat (0.606 ± 0.034 g/L) la cual fue similar a la obtenida en el tratamiento sin glucosa. En los tratamientos con paraquat (5, 10, 15 y 20 mg/L) la biomasa que se alcanzó fue de 0.271 a 0.678 g/L a las 216 h. El control fue diferente con respecto a los tratamientos, observándose una biomasa máxima de 2.707 ± 0.184 g/L a las 216 h (**Fig. 12**).

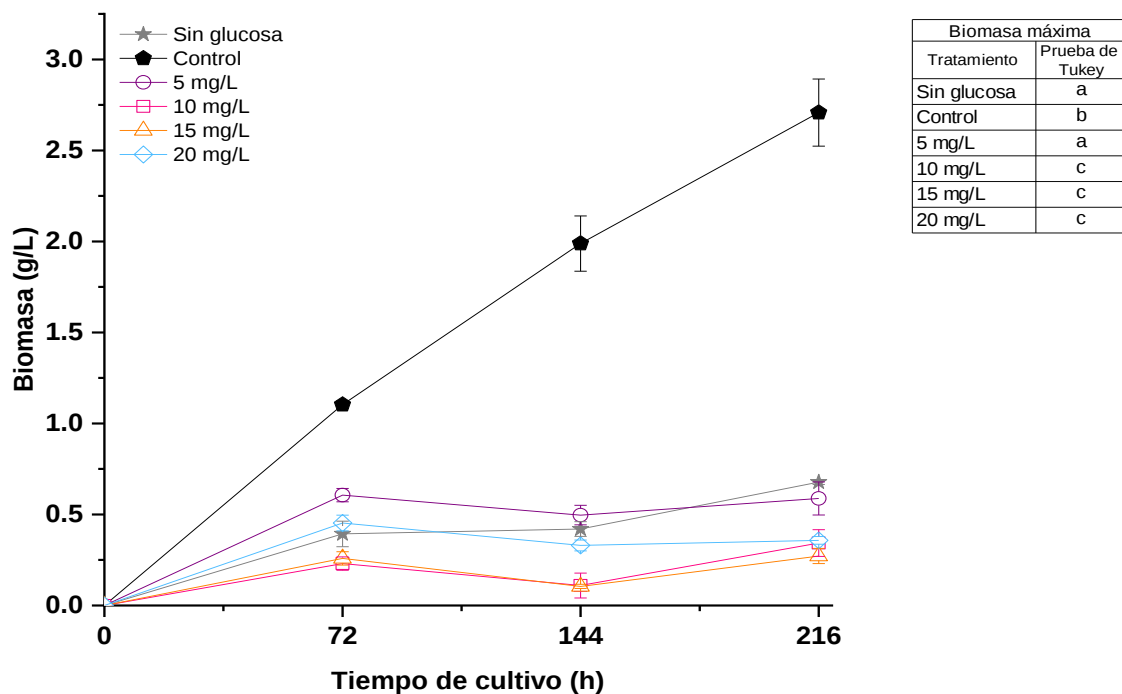


Figura 12. Crecimiento de *A. pediades* en cultivos líquidos adicionados con paraquat desde el inicio del cultivo. Cada punto representa el promedio $\pm$ SD de tres réplicas. En la tabla de la derecha se muestran los resultados de la prueba de Tukey para la biomasa máxima, letras diferentes significa que existen diferencias significativas $p < 0.05$.

En el caso del medio sin glucosa hubo crecimiento del micelio, en la primera etapa (**Fig. 11**) se puede observar el incremento de biomasa a las 72 h de cultivo, por otro lado, en la segunda etapa (**Fig. 12**) el crecimiento se mantiene durante el cultivo, muy probablemente con las reservas del cilindro de agar con el que se inoculó.

E incluso para esta segunda etapa, el tratamiento sin glucosa generó 0.678 ± 0.013 g/L de biomasa durante el cultivo. Un fenómeno parecido se observó en los tratamientos con paraquat, es decir, la presencia del compuesto en el cultivo no le permite crecer más allá de lo que crece sin reserva de glucosa -provista por el cilindro de agar- tomando como referencia la biomasa máxima producida en cada una de las fases del tratamiento sin glucosa, lo que indica que el herbicida paraquat es tóxico cuando se agrega al inicio del cultivo, independientemente de la concentración.

6.1.2. Inhibición del crecimiento de *A. pediades* por la adición de paraquat a las 72 horas del cultivo

A las 72 horas de incubación, la cepa de *A. pediades* generó 1.068 ± 0.101 g/L de biomasa, lo que permite saber cuál fue el crecimiento antes y después de agregar el paraquat. Se pudo observar que después de la adición del compuesto (72 h) y al cuantificar a las 144 h se mostró una disminución en la generación de biomasa (**Fig. 13**).

Existen diferencias significativas entre las medias de la biomasa máxima generada en cada tratamiento (ANOVA $F= 0.77.346$, $p < 0.0001$). Los tratamientos con paraquat (40, 60, 80 y 100 mg/L) no muestran diferencia entre sí, el tratamiento sin glucosa y el control fueron diferentes a los tratamientos con paraquat.

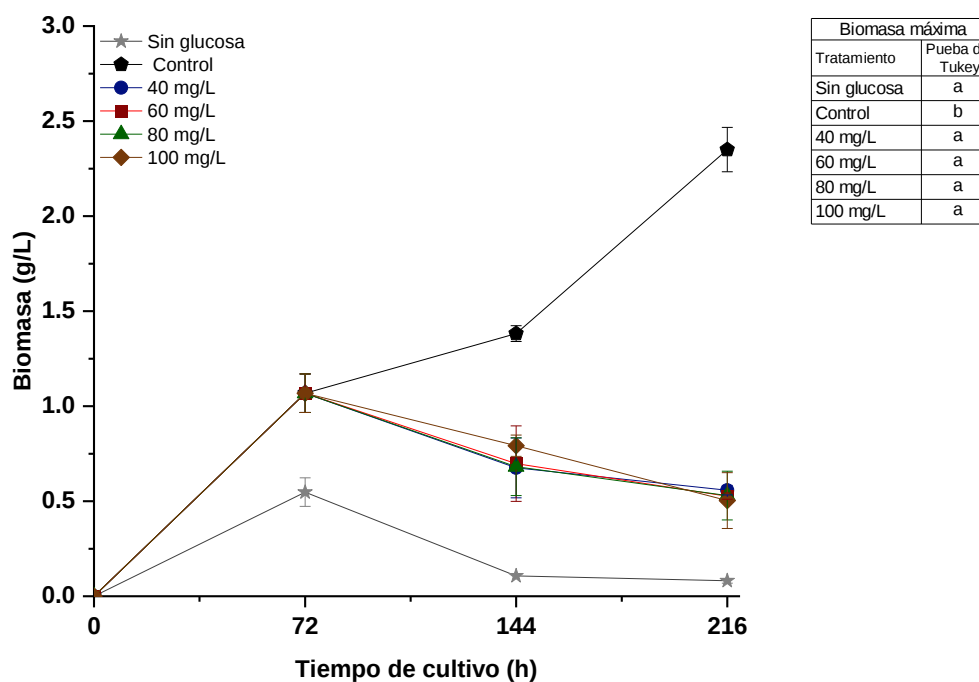


Figura 13. Crecimiento de *A. pediades* en cultivo líquido adicionado con paraquat a las 72 h. La biomasa a las 72 h fue de 1.068 ± 0.101 g/L. Cada punto representa el promedio $\pm$ SD de tres réplicas. En la tabla de la derecha se muestran los resultados de la prueba de Tukey para la biomasa máxima, letras diferentes significa que existen diferencias significativas $p < 0.05$.

Para las concentraciones menores del herbicida (5, 10, 15 y 20 mg/L) también adicionadas a las 72 horas de cultivo, se puede observar que a las 144 h después de la adición del paraquat (**Fig. 14**), existe una disminución en la generación de biomasa a excepción del tratamiento de 20 mg/L que se mantiene constante durante el cultivo, también se observó que a mayores concentraciones del herbicida (40, 60, 80 y 100 mg/L) la biomasa disminuye.

Existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la biomasa máxima de cada grupo (ANOVA $F= 118.407$, $p < 0.0008$). Se mostró que, el tratamiento sin glucosa y el tratamiento con 10 mg/L fueron diferentes a los tratamientos de 15 y 20 mg/L de paraquat, mientras que los tratamientos de 15 y 20 mg/L no fueron diferentes, con respecto al control este fue diferente a todos los tratamientos.

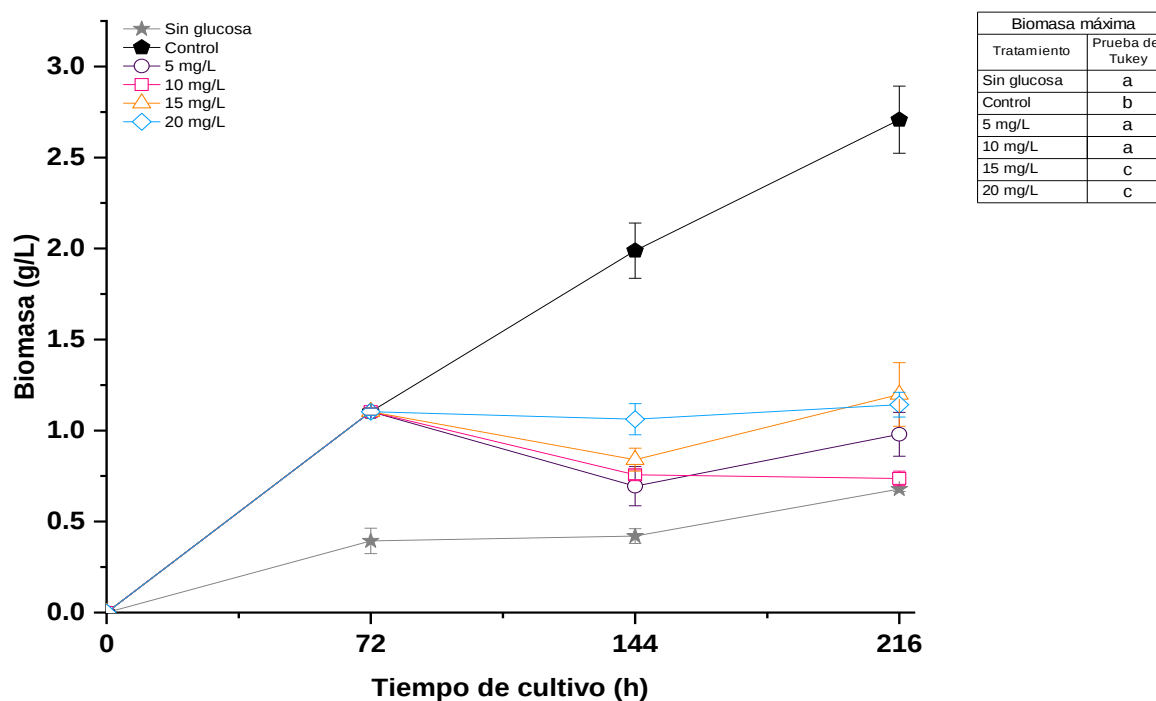


Figura 14. Crecimiento de *A. pediculus* en medio de cultivo con adición de paraquat a las 72 h. la biomasa a las 72 h fue de 1.103 ± 0.02 g/l. cada punto representa el promedio $\pm$ SD de tres réplicas. En la tabla de la derecha se muestran los resultados de la prueba de Tukey para la biomasa máxima, letras diferentes significa que existen diferencias significativas $p < 0.05$.

Independientemente del momento de adición del paraquat (al inicio o a las 72 h) y de la concentración, éste inhibe el crecimiento de la cepa de *A. pediades* (CIGyA-002) por lo que le resulta tóxico aún a una concentración de 5 mg/L.

6.2. Toxicidad de bajas concentraciones de paraquat sobre el crecimiento y caracterización del ECEE de *A. pediades*

En los experimentos anteriores, se encontró que el efecto del herbicida paraquat inhibe el crecimiento a concentraciones desde 5 mg/L desde las primeras horas del cultivo posteriores a su adicción. Con este antecedente se decidió trabajar con concentraciones de 2 mg/L y 5 mg/L, agregando el paraquat a las 72 h.

6.2.1. Crecimiento de *A. pediades* en medio con 2 y 5 mg/L de paraquat

El herbicida paraquat a concentraciones de 5 a 20 mg/L fue tóxico para *A. pediades* e inhibió su crecimiento. A las 72 h de cultivo y antes de la adición del paraquat la biomasa alcanzada fue de 0.399 ± 0.027 g/L (72 h). Existen diferencias significativas entre la biomasa máxima de cada tratamiento ($F= 288.949$, $p < 0.0001$). El análisis de comparación múltiple mostró que existen diferencias significativas entre todos los tratamientos.

El control generó una biomasa máxima de 2.292 ± 0.134 g/L a las 432 h con respecto a los tratamientos de 2 y 5 mg/L de herbicida. Por otro lado, los tratamientos con 2 y 5 mg/L de paraquat alcanzan una biomasa máxima de 0.977 ± 0.058 y 0.558 ± 0.062 g/L a las 432 h y 360 h respectivamente (**Fig. 15**).

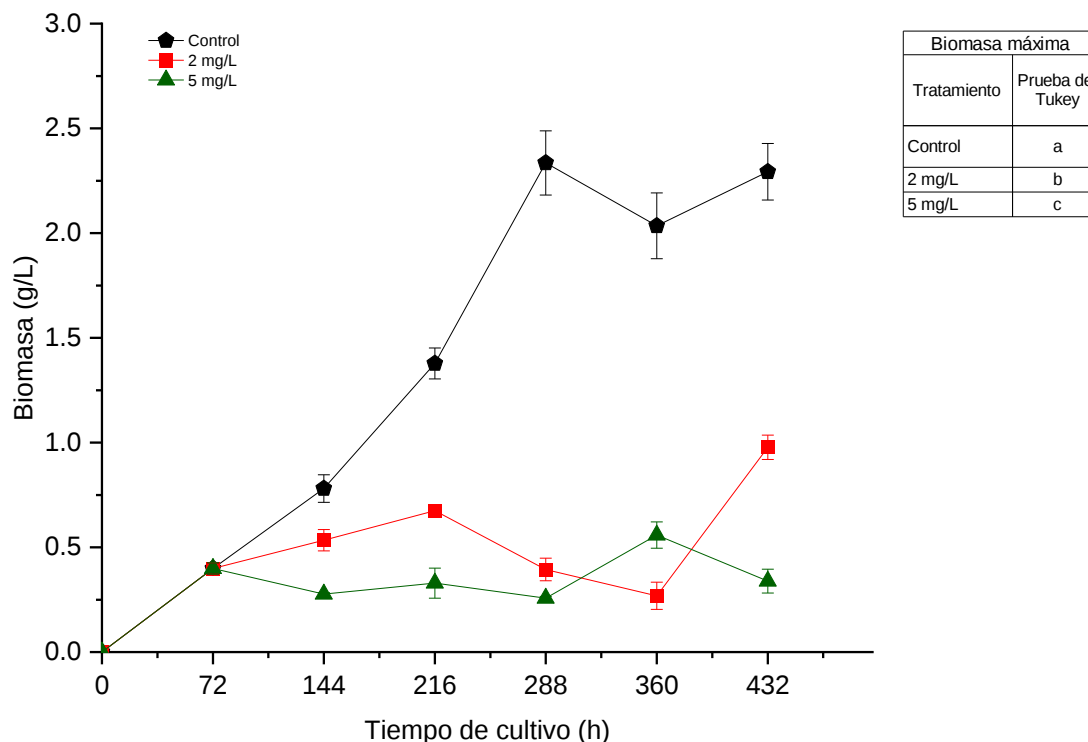


Figura 15. Crecimiento de *A. pediades* en cultivos con adición de bajas concentraciones de paraquat a las 72 h. La generación de biomasa a las 72 h fue de 0.399 ± 0.027 g/L. Cada punto representa el promedio $\pm$ SD de tres réplicas. En la tabla de la derecha se muestran los resultados de la prueba de Tukey para la biomasa máxima, letras diferentes significa que existen diferencias significativas $p < 0.05$.

6.3. Variación del pH durante el tiempo de cultivo

Se midió el potencial de hidrógeno (pH) durante el cultivo de todos los tratamientos; el pH inicial fue de 5.43, se observó que el control comienza a acidificar más el medio a partir de las 144 h, el pH más ácido del control durante el cultivo se encontró a las 288 h (4.59 ± 0.017). Sin embargo, el tratamiento con 2 mg/L mantiene el valor de pH cercano al del medio sin inocular. El pH más ácido para este tratamiento se obtuvo a las 144 h (5.143 ± 0.035). El tratamiento con la concentración de 5 mg/L se mantiene con un pH cercano al de 2 mg/L, a esta concentración de paraquat el pH más ácido durante el cultivo fue a las 288 h (4.946 ± 0.096). Estos datos

podrían sugerir que la presencia del paraquat genera cambios en el metabolismo del hongo.

El análisis estadístico (ANOVA) realizado para los pH más ácidos alcanzados durante el cultivo de cada tratamiento, muestran que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($F=191.668$, $p < 0.0001$). El tratamiento de 2 mg/L de paraquat, presentó valores de pH ligeramente cercanos a 5.5, menos ácido con respecto al control y no existen diferencias entre los tratamientos de 2 y 5 mg/L de paraquat (**Fig.16**).

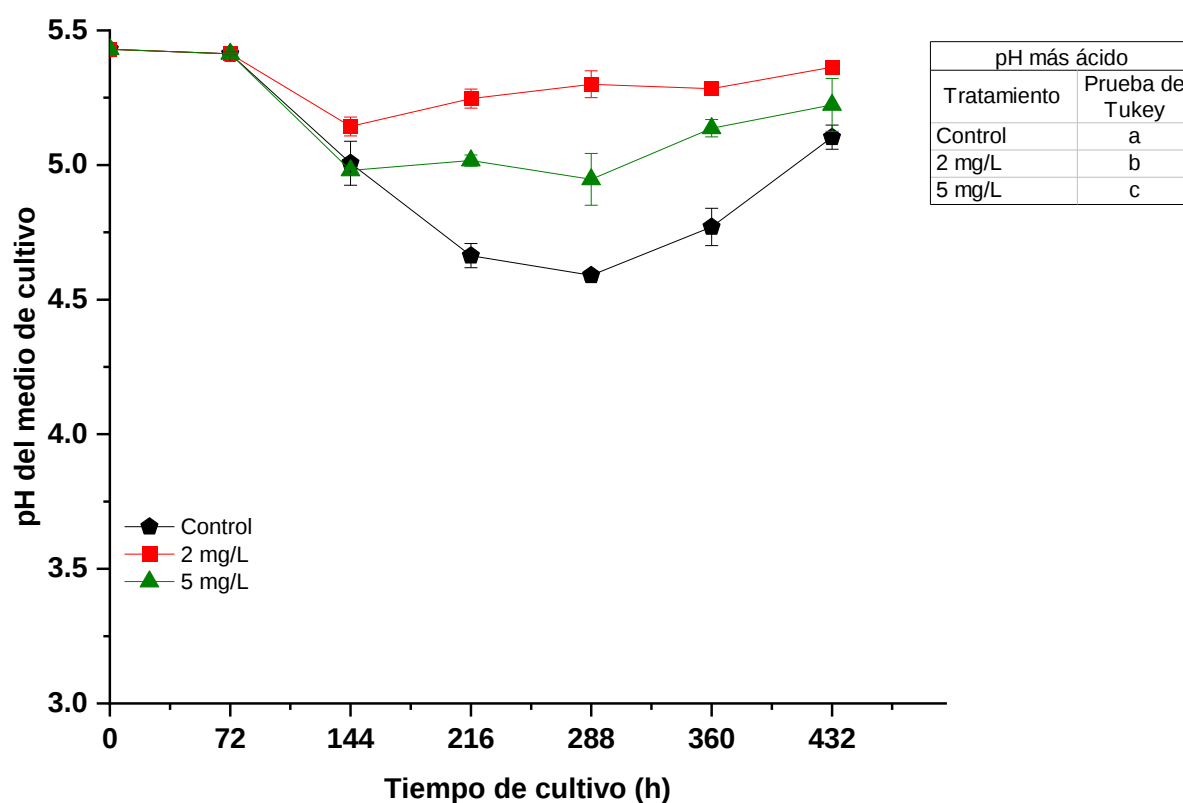


Figura 16. pH observado durante el cultivo de *A. pediades*. Cada punto representa el promedio $\pm$ SD de tres réplicas. En la tabla de la derecha se muestran los resultados de la prueba de Tukey a pH más ácidos, letras diferentes significa que existen diferencias significativas $p < 0.05$.

6.4. Consumo del sustrato

Como se puede observar en la **Fig. 17**, el consumo de glucosa para los tratamientos control y 2 mg/L de paraquat aumenta con respecto al tiempo. A las 360 h en el control sin herbicida el consumo de glucosa fue de 2.769 ± 0.046 g/L, mientras que en el tratamiento con 2 mg/L de herbicida fue de 2.450 ± 0.266 g/L a las 360 h. El tratamiento con la concentración de 5 mg/L de paraquat incrementó el consumo de glucosa a las 144 h (2.954 ± 0.230 g/L) decreciendo en los tiempos siguientes y teniendo un consumo final de 2.149 ± 0.244 g/L a las 360 h.

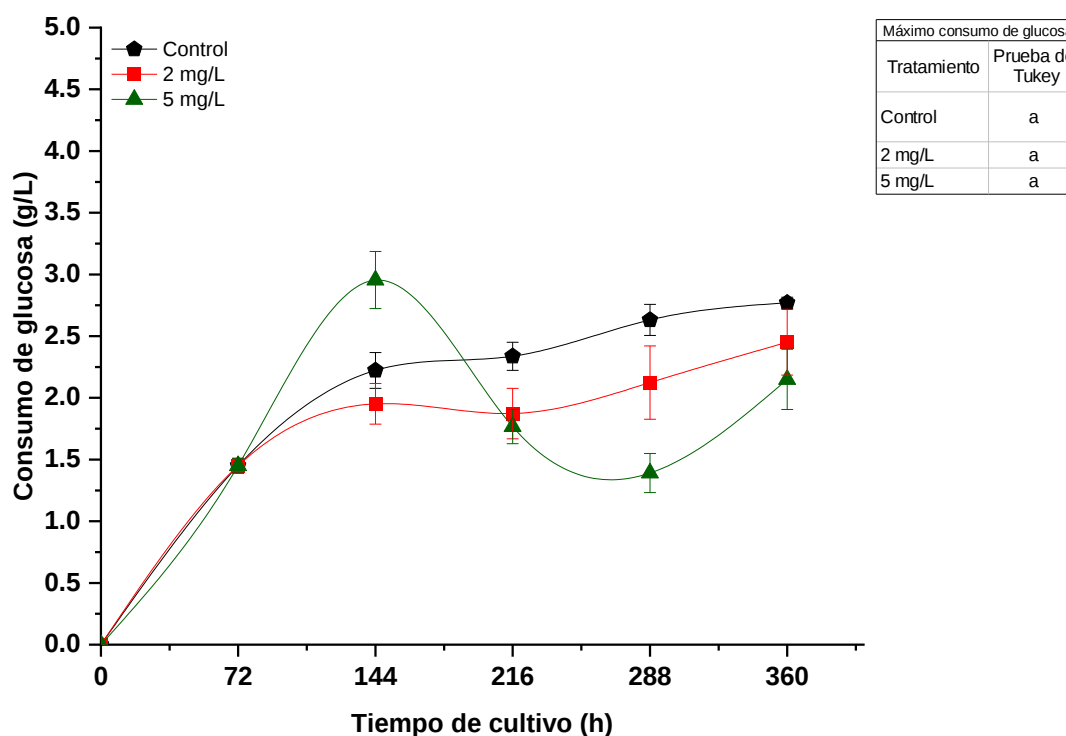


Figura 17. Consumo de glucosa durante el cultivo de *A. pediades* con bajas concentraciones de paraquat. Cada punto representa el promedio $\pm$ SD de tres réplicas. En la tabla de la derecha se muestran los resultados de la prueba de Tukey, para el consumo máximo de glucosa, letras diferentes significa que existen diferencias significativas $p < 0.05$.

El consumo máximo de glucosa en cada tratamiento muestra que no existen diferencias significativas en el consumo de glucosa entre los tratamientos.

Relacionando el consumo de glucosa con la generación de biomasa, el control muestra mayor crecimiento de *A. pediades* y existe mayor consumo de glucosa con respecto al tiempo; en los tratamientos de 2 y 5 mg/L de paraquat, la cantidad de biomasa generada es mínima, sin embargo, *A. pediades* sigue consumiendo glucosa en el tratamiento de 5 mg/L lo que indica que su metabolismo aún sigue activo. Por otro lado, en el tratamiento con 2 mg/L de paraquat se puede observar que hay un ligero consumo durante el cultivo, pero estadísticamente, el consumo se mantiene durante el cultivo.

6.5. Actividad específica extracelular de lacasas

La actividad específica de lacasas en el ECEE a las 72 h de cultivo, antes de la adición del herbicida fue de 0.927 ± 0.041 UI/ mg de proteína total. En el control sin paraquat se observó que a las 144 h se alcanzó la actividad máxima de lacasas en el ECEE (1.671 ± 0.051 UI/mg), con actividad disminuida a las 216 y 288 h y casi nula hasta el final del cultivo. En el tratamiento con 2 mg/L del herbicida, la actividad lacasa disminuye luego de la adición del paraquat hasta las 360 h, mostrando un pico máximo de actividad a las 432 h alcanzando una actividad máxima de 1.324 ± 0.015 UI/mg.

En el tratamiento con 5 mg/L la actividad disminuye hasta las 216 h e incrementa a partir de las 288 h, presentando una actividad estable durante los siguientes tiempos y hasta el final del cultivo, alcanzando una actividad máxima de 1.511 ± 0.091 UI/mg a las 360 h (**Fig. 18**).

Los análisis de ANOVA muestran diferencias significativas entre las actividades lacasa máxima de los tres tratamientos ($F= 24.280$, $p < 0.001$) y se observó que todos los tratamientos fueron diferentes.

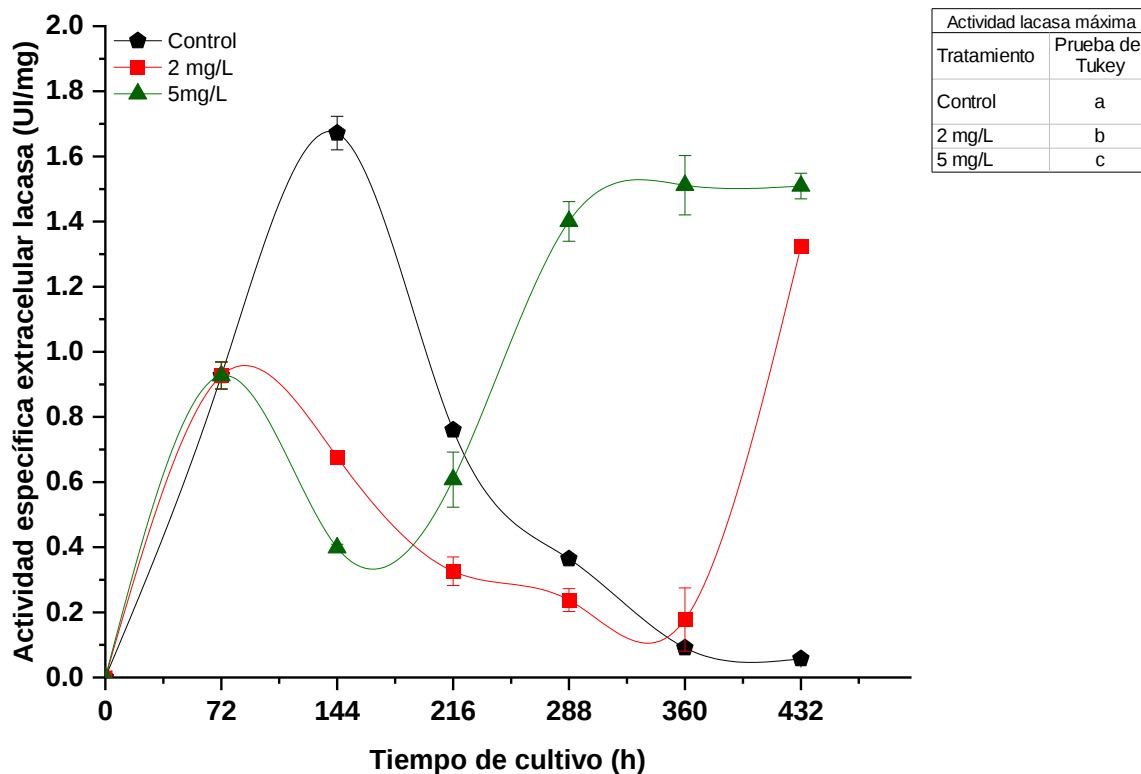


Figura 18. Actividad específica extracelular lacasa durante el crecimiento de *A. pediades*. Cada punto representa el promedio $\pm$ SD de tres réplicas. En la tabla de la derecha se muestran los resultados de la prueba de Tukey para la actividad específica lacasa máxima de cada tratamiento, letras diferentes significa que existen diferencias significativas $p < 0.05$.

Los resultados sugieren que el paraquat cambia los patrones de producción de la enzima lacasa, así como la magnitud de su actividad, aparentemente, disminuyendo las unidades de actividad máxima en un 21 % para los tratamientos con 2 mg/L de paraquat y en un 10 % para el tratamiento con 5 mg/L de herbicida, considerando la actividad máxima obtenida en el control que representa el 100 % (1.671 ± 0.051 UI/mg). Sin embargo, se debe considerar que la actividad también se da en función de la cantidad de biomasa producida y en este sentido, la biomasa generada por el hongo en los tratamientos con paraquat está disminuida (0.977 ± 0.058 y 0.338 ± 0.0571 g/L de biomasa a las 432 h de cultivo para los tratamientos de 2 y 5 mg/L de paraquat, respectivamente) con respecto al control,

lo que muestra que la actividad de lacasas en estos cultivos se está magnificando, lo que podría sugerir que el herbicida promueve este incremento. Se puede observar también, que en el tratamiento con 5 mg/L de paraquat, la actividad se mantiene constante más tiempo que en los otros dos tratamientos, y en el tratamiento de 2 mg/L de herbicida la actividad solo se incrementa al final del cultivo, lo que indica que está alterando de forma significativa el metabolismo de esta cepa. También, se observó que durante el tiempo de cultivo el medio comenzó a adquirir un color amarillo-oscuro (5.5Y 7/6) (**Fig. 19**). Tiempo en donde aparentemente *A. pediades* comienza la fase de muerte (Torres, 2017).

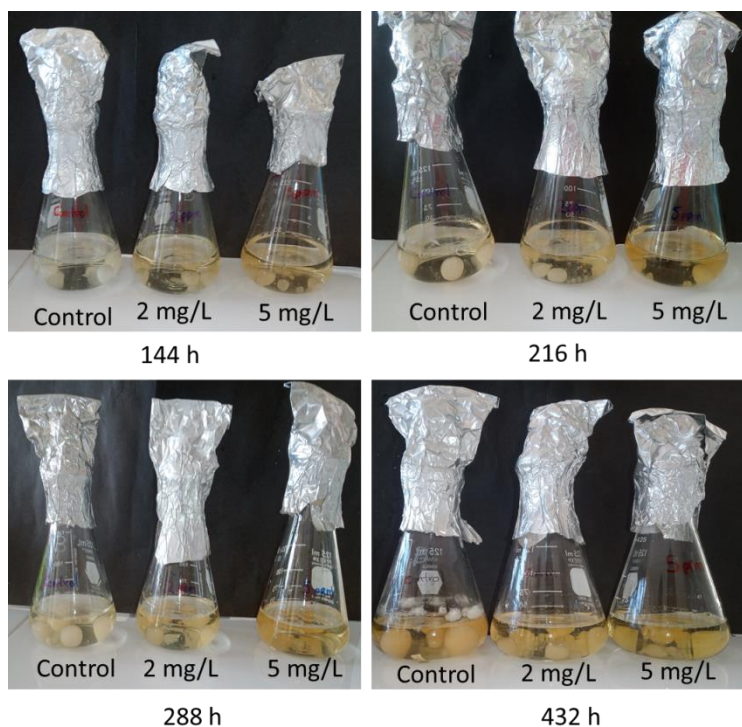


Figura 19. Durante el crecimiento de *A. pediades* a las diferentes concentraciones de paraquat, el medio de cultivo comienza a cambiar de color (2.5Y 8/4 a 5.5Y 7/6 al final del cultivo) y el micelio comienza a tornarse color café (10YR 5/6) al final del cultivo, incluyendo al tratamiento sin Paraquat.

6.6. Perfiles de lacasas

En los zimogramas se puede observar una mayor oxidación de DMP en los ECEE de los tratamientos de 2 y 5 mg/L de paraquat a partir de las 216 h (**Fig. 20**). En todos los cultivos se observó una banda por debajo de los 75 kDa lo cual concuerda con los resultados previamente obtenidos por González (2021) para esta cepa.

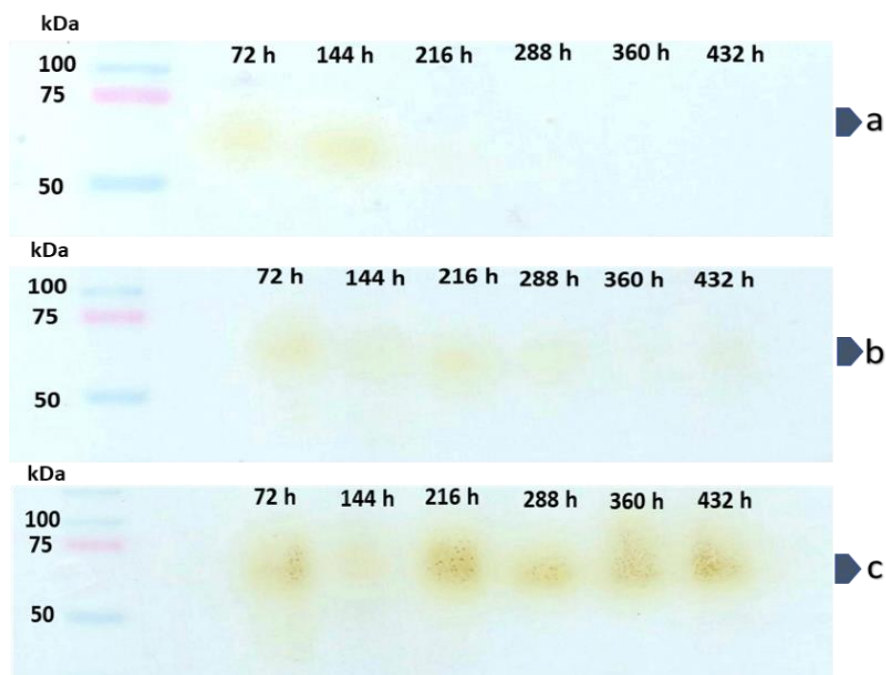


Figura 20. Perfil de isoformas con actividad lacasa de *A. pediades*. a) control sin paraquat, b) Tratamiento con 2 mg/L de paraquat y c) Tratamiento con 5 mg/L de paraquat.

6.7. Alteraciones en la diferenciación morfológica de las hifas de *A. pediades* causadas por el paraquat

Se realizó la comparación morfológica de las hifas a los objetivos 10X, 40X y 100X (**Fig. 21**); con ayuda del programa Image J (2021) se midió el ancho de las hifas a 100X. Las observaciones se realizaron en control (medio sólido) sin paraquat, donde el diámetro de las hifas va de (0.8-) 1-2 μm , esta media sirve como referencia del estado normal de las células del hongo.

Las observaciones de las hifas desarrolladas en medio líquido fueron las siguientes: Para el control (medio líquido) sin paraquat el diámetro de las hifas va de 0.8-1 μm ; para el tratamiento con 2 mg/L de paraquat fue de 1- 2 (- 3) μm y para el tratamiento con 5 mg/L fue de (- 1) 2 - 3 μm (**Fig. 21**). Se pudo observar que las hifas en el cultivo sólido son ligeramente más gruesas y definidas que las del cultivo líquido, además se observó que presentan más fíbulas que los tratados con paraquat, sin embargo, no se realizó el conteo de fíbulas; el grosor de las hifas con paraquat se pueden observar más gruesas, con una mayor fragmentación del micelio, que no es ocasionada por la manipulación de la muestra.

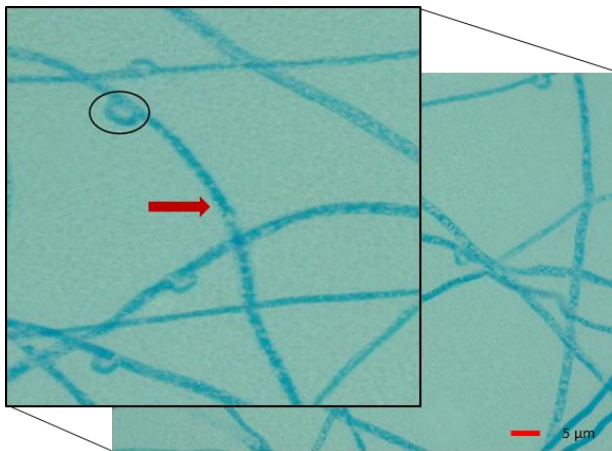


Figura a) Control (medio sólido)

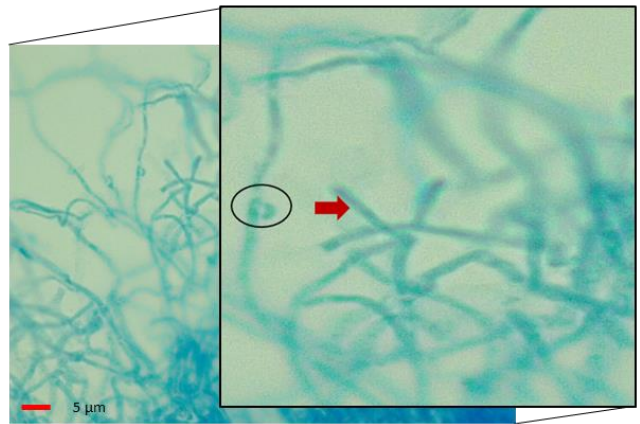


Figura b) Control (medio líquido)

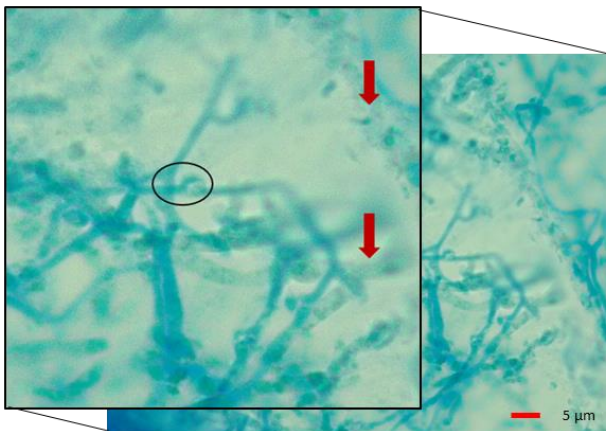


Figura c) 2 mg/L de Paraquat

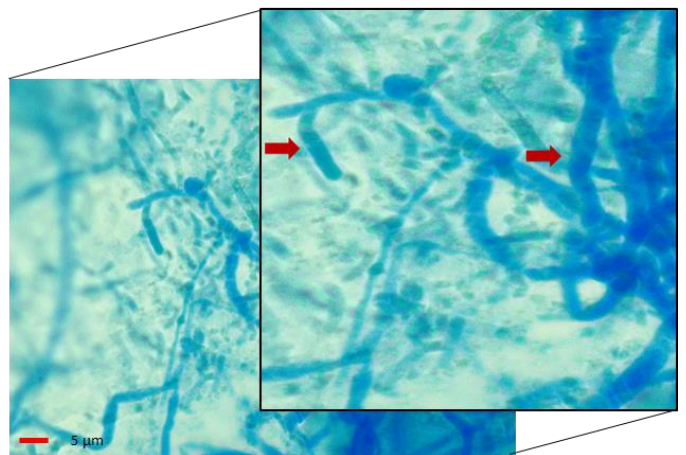


Figura d) 5 mg/L de Paraquat

Figura 21. Morfología de las hifas de la zona periférica de crecimiento, observadas al microscopio óptico 100X. Las muestras fueron tomadas a las 432 h del cultivo de *A. pediades*. En color rojo (➡) se muestran las estructuras hifales y en color negro (○) se muestran las estructuras llamadas fíbulas.

7. DISCUSIONES

7.1. Efecto tóxico del paraquat en el crecimiento de *A. pediades*

Agrocybe pediades es un hongo del que se han estudiado pocas propiedades. Al respecto de su tolerancia o adaptación a la contaminación por diversos compuestos xenobióticos solo existe el trabajo de Hernández (2021), quien registró su tolerancia a hexaclorobenceno. Los efectos por la exposición a pesticidas como el paraquat se han explorado en unas cuantas especies de hongos saprótrofos, pero no en *A. pediades*, siendo este el primer estudio en su tipo.

En este estudio *A. pediades* (cepa CIGyA-002) no fue tolerante a la presencia del herbicida paraquat en el medio de cultivo (líquido), comparado con dos cepas de otro hongo saprótrofo *Polyporus*, las cuales muestran la capacidad de tolerar concentraciones de hasta 150 mg/L de paraquat (Camacho-Morales *et al.*, 2017), gracias a la excreción de enzimas lacasas, por lo que se puede concluir que no todas las especies fúngicas son tolerantes a este herbicida solo por excretar enzimas lacasas. Aunque *Polyporus* y *Agrocybe* son basidiomicetos, pertenecen a órdenes taxonómicos distintos, por lo tanto, su respuesta ante el estrés oxidativo fue distinta, probablemente influenciada por factores como el ambiente en el que se encuentran y el acervo genético que poseen, que, aunque les permita hacer frente a diferentes condiciones ambientales, en algunas especies será más apropiado o podrá activarse de manera más efectiva que en otras. Como es el caso del hongo *Paracoccidioides brasiliensis*, quien al estar en contacto con el paraquat incrementa la síntesis de la pared celular, como mecanismo de defensa al estrés oxidativo causado por este herbicida (Vinícius *et al.*, 2013) y es posible que *A. pediades* carezca de mecanismo.

Cuando el herbicida se adicionó después de iniciado el crecimiento del hongo, a las 72 h, aunque los resultados muestran que el hongo creció muy poco, a expensas de los nutrimentos del segmento de agar, se considera que a partir de ese momento su crecimiento estuvo comprometido, hasta las 360 h. Es muy importante resaltar que, de acuerdo con los resultados de este trabajo, la toxicidad del paraquat hacia

A. pediades no depende específicamente de la dosis, ni del tiempo en el que se agrega el compuesto, sino del mecanismo de acción y de la aparente incapacidad de *A. pediades* para crecer en presencia de paraquat.

7.2. Alteraciones fisiológicas en *A. pediades* por la presencia de paraquat

El pH es un factor determinante que influye de manera directa en el crecimiento de los organismos fúngicos, los hongos mesófilos pueden llegar a crecer en un intervalo de pH de 4 a 8.5 (Cervantes-Martínez *et al.*, 2017), pero la mayoría prefiere un pH ligeramente ácido (Barba *et al.*, 2019). Estudios realizados en tres especies de hongos ectomicorrícicos (*Rhizopogon luteolus*, *Suillus bellinii* y *Suillus luteus*), sugieren que, los hongos acidifican el medio de cultivo como estrategia propia de cada especie, para aumentar la biodisponibilidad de nutrientes, aunado a ello, la producción de ácidos orgánicos durante el crecimiento también puede modificar el pH inicial del cultivo (Pereira *et al.*, 2007). Como sucedió con los cultivos de *A. pediades* (**Fig. 16**). Se pudo observar que la cepa CIGyA-002 de *A. pediades* modifica los perfiles de pH dependiendo de la concentración del herbicida, siendo más ácido el medio sin paraquat. Lo mencionado anteriormente, se debe a los productos que excretan durante su crecimiento y se ha reportado de forma general que, a mayor actividad metabólica se incrementa la cantidad de CO₂ en el medio (Pardo-Plaza *et al.*, 2019). Como sucede en el metabolismo de *Aspergillus niger* en donde la producción de biomasa se relaciona directamente con el incremento de CO₂ durante su cultivo (Reyes-Ocampo *et al.*, 2013). En este sentido, el CO₂ al estar en contacto con el agua (H₂O) se forma el ácido carbónico (H₂CO₃) que por un lado dejaría libre los iones bicarbonato (HCO₃¹⁻) y por otro generarían iones hidrógeno (H¹⁺) que son los responsables de la acidificación del medio (Chávez *et al.*, 2017; Vélez-Páez, 2021). Sin embargo, el tratamiento con 2 mg/L tienen un pH menos ácido con respecto al control y al tratamiento con 5 mg/L, eso no significa que el metabolismo haya cesado, sino que, la mayor parte del sustrato se destina al mantenimiento celular como menciona Ferrer-Romero *et al.* (2019). En este sentido, la cepa CIGyA-002 de *A. pediades* puede estar resistiendo por un determinado tiempo hasta que las condiciones cambien, ya que no gasta energía en crecer, sino

en mantener las funciones indispensables para su sobrevivencia. De igual forma, se puede atribuir a la concentración de 2 mg/L un efecto fungicida (efecto retardado) en *A. pediades* ya que el crecimiento es mínimo (Racines-Oliva *et al.*, 2019). En el tratamiento con 5 mg/L de paraquat *A. pediades* acidificó más el medio con respecto al tratamiento con 2 mg/L de paraquat, al mismo tiempo que el crecimiento disminuyó con respecto al tratamiento de 2 mg/L. Por lo que, se cumple la correlación, a mayor actividad metabólica y crecimiento micelial el pH disminuye, a diferencia de los estudios realizados con ectomicorrizas (Pereira *et al.*, 2007).

Con respecto a los resultados obtenidos de consumo de sustrato, Hernández (2021) observó que durante el crecimiento de *A. pediades*, disminuyó la concentración de glucosa en el medio debido a que el consumo está relacionado con la generación de biomasa en hongos saprótrofos (Duarte-Trujillo *et al.*, 2020). Así mismo, se ha descrito en otros hongos como *P. ostreatus* un ligero aumento en la concentración de glucosa residual, asociado con la secreción de exopolisacáridos que pueden contener residuos de monosacáridos como: glucosa, manosa, galactosa y glucosamina (Ferrer-Romero *et al.*, 2019). Sin embargo, la concentración de estos monosacáridos es mayor cuando las relaciones C/N disminuyen en el cultivo (Ferrer-Romero *et al.*, 2019). En este estudio, el control tiene mayor crecimiento a mayor consumo de glucosa como menciona Ferrer-Romero *et al.*, (2019) para *P. ostreatus* —otro hongo saprótrofo—, y los tratamientos que contenían paraquat (2 y 5 mg/L) también consumieron glucosa, sin embargo, la producción de biomasa fue mínima con respecto al control sin paraquat. Estos resultados se asocian con la excreción de enzimas lacasas y es posible que *A. pediades* no esté utilizando el sustrato para generar biomasa, sino, para la producción de enzimas.

7.3. Efectos del paraquat en la excreción de enzimas lacasas de *A. pediades*

7.3.1. Actividad enzimática específica de lacasa

En este sentido, se ha reportado que algunos compuestos tóxicos probados en basidiomicetos —diferentes a *A. pediades*—, pueden alterar el metabolismo y la expresión de enzimas encargadas de la degradación de materia orgánica, como es el caso de las lacasas, ampliamente utilizadas en el área de biorremediación (Valdés *et al.*, 2020). En este estudio la actividad específica lacasa del tratamiento con 5 mg/L aumentó al estar en contacto con el herbicida paraquat, pero el crecimiento de *A. pediades* se ve comprometido, como sucede en el estudio realizado por Jaszek *et al.* (2006), en donde el aumento de la actividad lacasa en *Trametes versicolor* y *Abortiporus biennis* pertenecientes a los hongos Basidiomycetes se relaciona con la pérdida de peso seco (**Fig. 18**). Por otro lado, el aumento de la actividad lacasa puede deberse al mecanismo de acción de este herbicida, que a través de la generación de radicales libres altera las funciones celulares, pudiendo así mismo alterar la expresión de numerosos genes, sin embargo, la concentración del paraquat de 2 mg/L no aumentó la excreción de enzimas lacasa sino hasta el final del cultivo, cuando el medio comenzó a adquirir un color amarillo-oscuro (5.5Y 7/6) (**Fig. 19**), resultado que fue diferente al reportado por Jaszek *et al.* (2006) en las cepas de *Trametes versicolor* y *Abortiporus biennis*.

En este estudio no se evaluó la expresión génica para corroborar que efectivamente el aumento de la actividad específica lacasa se debiera a genes que se sobreexpresan de forma aleatoria por el daño celular.

Por otro lado, *A. pediades* podría estar contrarrestando el efecto del paraquat con la excreción de dichas enzimas. Se ha reportado que el aumento de la excreción de las enzimas lacasas se asocia con la tolerancia al estrés abiótico en algunos hongos (Fang *et al.*, 2010), además, las lacasas juegan un papel muy importante en el desarrollo de cuerpos fructíferos y la protección frente a compuestos fenólicos tóxicos liberados durante la degradación de lignina (Archibald *et al.*, 1997). El

aumento de la actividad lacasa se puede atribuir al potencial que los hongos poseen para la degradación de esos compuestos (Román *et al.*, 2010).

Camacho-Morales *et al.* (2017) al estudiar la degradación del paraquat utilizando hongos de podredumbre blanca, observaron que la especie *Deconica citrispora* (ECS-77) no mostró un aumento en la actividad de lacasa a diferencia de las otras cepas, sin embargo, registro el mayor porcentaje de degradación de este compuesto (47 %). En este sentido, no todas las lacasas son eficientes para la degradación, pues ésta depende de la especie fúngica y de sus hábitos de vida, así como del grado de glicosilación de la enzima (Baldrian, 2006). La glicosilación es responsable de su estabilidad estructural (Baldrian, 2006), de su protección contra la proteólisis y de la inactivación por radicales libres (Morozova *et al.*, 2007) ya que constituye una modificación postraduccional importante para las proteínas o enzimas que van a ser excretadas (López, 2013). Por ello, es interesante conocer si la actividad lacasa que se reporta con el método espectrofotométrico corresponde a una o varias isoenzimas lacasas.

7.3.2. Perfiles de actividad de lacasas

En cuanto a los perfiles de actividad lacasa, con respecto a la respuesta por estrés oxidativo en *A. pediades* no se ha reportado. En este trabajo se logró ver una banda que se encontró alrededor de los 75 kDa que coincidió con los resultados obtenidos por González (2021), donde no se observó otra isoenzima de lacasa cuando sometieron a la cepa de *A. pediades* en presencia de hexaclorobenceno y cobre como inductores, estos resultados sugieren que la presencia de algún xenobiótico no necesariamente inducirá nuevas isoenzimas. Aunado a ello, los resultados que se obtuvieron coinciden con los obtenidos por Jaszek *et al.* (2006), es decir el paraquat no indujo nuevas isoformas en las cepas *Trametes versicolor* y *Abortiporus biennis*. Sin embargo, en otros estudios realizados por Torres (2017) y Silva-León (2019), en donde no se agrega ningún compuesto tóxico, pero se modifican las condiciones del cultivo y de la temperatura, se logró observar más de una banda con actividad lacasa (**Fig. 20**).

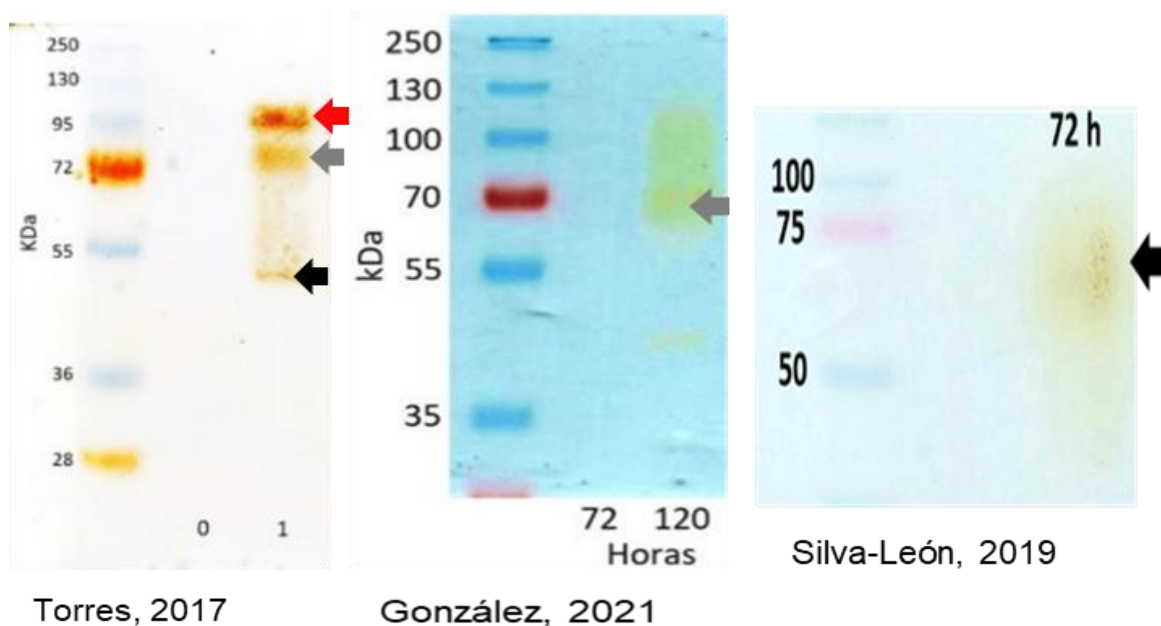
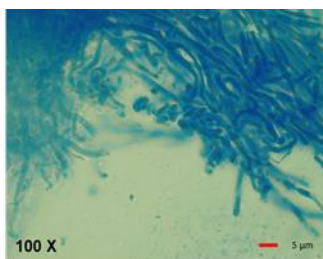


Figura 22. Comparación de un zimograma obtenido del tratamiento con concentraciones de paraquat de 5 mg/L. Las fechas del mismo color en los zimogramas indican las bandas que son análogas.

7.4. Efecto del paraquat en la morfología de *A. pediades*

Adicionalmente, se determinó que el paraquat daño el micelio de *A. pediades*, fragmentándolo. Una de las observaciones más cercanas al respecto, es proporcionada por Sánchez (2021) quien sometió el micelio de *A. pediades* a tratamiento enzimático para provocar la lisis de la pared celular y obtener protoplastos. Este autor, por medio de la tinción fúngica mostró con toda claridad alteraciones en la morfología de las hifas —como ensanchamientos—, que evidencian la disociación de la pared celular para la liberación de protoplastos. En este estudio las observaciones morfológicas revelan que el tratamiento con paraquat fue más agresivo con las hifas de *A. pediades* que las enzimas líticas usadas por aquel autor para alterar la integridad de la pared celular (Sánchez, 2021. (Fig. 23)). De acuerdo con la información técnica del paraquat, una vez que éste ingresa a la célula vegetal a la que está dirigido (dado que es un herbicida), o entra en contacto con electrones libres producidos por el metabolismo vegetal, éstos reaccionan con el ion paraquat produciendo la forma de radical libre. Cuando el

oxígeno reconvierte el radical libre y se produce peroxidación, los productos atacan a los ácidos grasos no saturados de la membrana, abriéndola y desintegrándola de manera continua por el reciclaje del paraquat/radical libre, hasta que se agota el suministro de electrones libres y la célula muere a consecuencia de la pérdida de la integridad y de la protección dadas por la pared celular (Blokhina *et al.*, 2003; Syngenta, 2021; TECNOAGRÍCOLA, 2021). Este mecanismo está bien descrito para las plantas y constituye el principio bajo el cual actúan el paraquat y otros herbicidas, pero poco se conoce sobre los efectos de éstos en hongos y en otros organismos dotados de pared celular. Por ejemplo, en *Paracoccidioides brasiliensis*, hongo saprófito del suelo —que a su vez puede actuar como patógeno de mamíferos—, el estrés causado por paraquat promueve la expresión de genes que ayudan a la síntesis de quitina, actuando probablemente como mecanismo compensatorio ante el efecto del herbicida, para regular la entrada o impedir el paso del compuesto por la formación constante de uno de los principales carbohidratos complejos que conforman la pared celular de los hongos (Vinícius *et al.*, 2013). Este fenómeno contrasta completamente con los resultados obtenidos en este estudio; esto lleva a considerar la posibilidad de que, aun cuando *A. pediades* también es un hongo saprófito, carezca de mecanismos de defensa como los exhibidos por *P. brasiliensis*.



Sánchez, 2021

Figura 23. Comparación morfológica de las hifas de *A. pediades* tratadas con enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* 100X (Sánchez, 2021).

En los tratamientos probados (2 y 5 mg/L) de paraquat, se observó que la pared celular de *A. pediades* está alterada, lo que sugiere que el herbicida está dañando esta estructura, ya que se encontraron fragmentos del micelio completamente desprendidos, además, afecta la permeabilidad celular, alterando la turgencia

natural e intrínseca de las células fúngicas (hinchamiento celular ver **Fig. 21 B y C**). Debido a que la membrana celular queda expuesta, es muy probable que el ingreso y la salida de compuestos desde y hacia la célula estén alterados (Roa y Rosas, 2013). De manera adicional, en *A. pediades* se observó que el paraquat alteró la formación de fíbulas, rasgo morfológico típico del grupo de hongos al que pertenece, siendo una muestra indirecta del efecto del herbicida en la diferenciación celular, ya que estas estructuras son fundamentales para mantener el micelio viable y que los hongos puedan tener una colonización exitosa como se ha reportado para *Pleurotus spp.* (Sánchez y Royse, 2001).

.

8. CONCLUSIONES

El paraquat es tóxico para *A. pediades* a todas las concentraciones probadas en este estudio, ya que compromete su crecimiento, independientemente del momento en el que se adicione el herbicida.

El pH, el consumo de glucosa y la actividad lacasa durante el cultivo de *A. pediades* sugieren que el paraquat altera las funciones fisiológicas y es posible que este compuesto modifique la integridad celular y ocasione la fragmentación de las células dejando expuesto el material intracelular e inhibiendo la síntesis de numerosas enzimas.

La presencia del paraquat en el medio de cultivo incrementa la actividad de enzimas lacasas extracelulares, pero no induce nuevas isoenzimas.

Las observaciones realizadas a las 432 h de cultivo de los tratamientos con paraquat (2 y 5 mg/L), muestran que este herbicida afecta la integridad de la pared celular de las hifas de *A. pediades* y que probablemente interfiere en el proceso de diferenciación celular.

9. PERSPECTIVAS

Análisis para el medio de cultivo en *A. pediades*

- ¿La concentración de paraquat disminuirá en el medio de cultivo durante el crecimiento de *A. pediades*? ¿El paraquat tendrá la capacidad de transformarse en otro compuesto?

Es necesario caracterizar el medio de cultivo donde se encuentra el paraquat añadido a través de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), para identificar, cuantificar, separar y purificar los distintos compuestos presentes en el medio de cultivo, de esta forma se tendría evidencia de lo que está pasando con este compuesto ante la presencia del hongo e incluso del medio de cultivo.

Análisis de las enzimas lacasas de *A. pediades*

- ¿Las enzimas lacasas tendrán la capacidad de degradar o transformar el paraquat? En este sentido, es necesaria la purificación de la enzima para las pruebas de degradación *in vitro*, lo que permitirá generar información importante para las áreas de biotecnología y biorremediación.
- ¿La expresión de enzimas lacasas a nivel de ARNm se relacionará con su excreción a nivel de proteína? Evaluar la expresión a nivel de ARN mensajero de los genes que codifican a las enzimas lacasas permitirá conocer si el paraquat modifica la regulación de dichos genes en *A. pediades*.

Análisis enzimático de *A. pediades*

- ¿Cómo intervienen las enzimas del citocromo p450 de *A. pediades* al estar expuesto a estrés oxidativo generado por el paraquat? Es necesario evaluar el nivel de estrés oxidativo mediante la cuantificación de al menos tres enzimas claves del citocromo P450 para la detoxificación de las ERO: La superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa

(GPx) y la glutatión S-transferasa (GST), éstas enzimas están encargadas de la defensa antioxidante y tienen la capacidad de contrarrestar y de regular el nivel de las ERO.

- A nivel estructural ¿Cómo afectará el paraquat a la pared y a la membrana celulares de *A. pediades*? El análisis mediante la microscopia electrónica de transmisión podría estimar el daño causado por este compuesto a nivel estructural y evidenciar de forma directa, que el paraquat puede limitar la diferenciación celular en esta cepa.

10. LITERATURA CITADA

- Acharya, K., Sikder, R. y Dutta, A. K. (2017). Physiochemical characterization and antioxidant activity of methanol extract from an edible mushroom *Agrocybe pediades*. *International Journal of ChemTech Research*. 10(3), 204-211. URL: https://www.researchgate.net/publication/316698805_Physiochemical_characterization_and_antioxidant_activity_of_methanol_extract_from_an_edible_mushroom_Agrocybe_pediades
- Agenda de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). (2020). Seguridad laboral al usar pesticidas, Dicloruro de paraquat. URL: <https://espanol.epa.gov/seguridad-laboral-al-usar-pesticidas/dicloruro-de-paraquat>
- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J. y Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85, 76-81. DOI:10.7550/rmb.33649
- Álvarez, S. (2005). La descomposición de materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. *Ecosistema*. 14(2), 17-29. URL: [1132-6344 https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54014204](https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54014204)
- Andrews, J. H. y Harris, R. F. (2007) Evolutionary Ecology of the First Fungi. Kubicek, C. P. y Druzhinina, I. S. *The Mycota* (pp. 3-16). Springer.
- Archibald F.S., Bourbonnais R., Jurase K.L., Paise M.G., Reid I.D. (1997). Kraft pulp bleaching and deslignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*. 53, 215-336. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202089/pdf/aem00030-0290.pdf>
- Arenas, G. (2014). *Micología médica ilustrada, generalidades de los hongos, dermatofitosis*. McGraw-Hill Interamericana. URL: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1448§ionid=96273154>
- Armas, A., Marcial, J., Fernández, F. J., Estrada, A., Pérez E.A. y Montiel, A. M. (2019). Laccase gene silencing negatively effects growth and development in *Pleurotus ostreatus*. *Indian Journal of Biotechnology*. 18, 42-51. URL: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/47118>
- Ávila, N. R, Rivas P. B., Hernández, M. R. y Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Revista Multiciencias*. 12, 129-135. URL: <https://www.redalyc.org/pdf/904/90424216002.pdf>
- Baldrian, P. (2006). Fungal lacasses-ocurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*. 30, 215-242. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>

- Barba, B. M., Assumpcao, F.F., Aparecida, M. H., Lopes, T. G., Suelen Ávila, S., Silveira, H. P., Maccari J. A., Hoffmann, R. R. (2019). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26, 633-646. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>
- Barragán-Huerta, B. E., Cabrera-Soto, M. L., Cruz, M. T. y Pedroza-Rodríguez, A. M. (2015). The valorization of tequila industry agricultural waste through its use as a substrate for laccase production in a fluidized bed bioreactor. *ResearchGate*. 24 (6), 2026-2034. URL: https://www.researchgate.net/publication/280114918_The_valorization_of_tequila_industry_agricultural_waste_through_its_use_as_a_substrate_for_laccase_production_in_a_fluidized_bed_bioreactor
- Batista, W.B., y Platt, W. J. (2003). Tree population responses to hurricane disturbance: Syndromes in a south-eastern USA old-growth forest. *Journal of Ecology*. 91, 197-212. URL: <https://www.jstor.org/stable/3599755>
- Bauer, R., Begerow, D., Sampaio, J. P., Weiss, M. y Oberwinkler, F. (2006). 'The simple-septate basidiomycetes: A synopsis'. *Mycological Progress*. 5, 41–66. DOI 10.1007/s11557-006-0502-0
- Bennett, J.E. (2006). Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. *N Engl J Med*. 355, 1154-9. DOI: 10.1056/NEJMct060052
- Berry, C., La-Vecchia, C. y Nicotera, P. (2010). paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ*. 17, 1115-1124. DOI: 10.1038/cdd.2009.217
- Blokhina, O., Virolainen, E. y Frgerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 91, 179-194. DOI: 10.1093/aob/mcf118
- Bonkowski, M., Griffith, B. S. y Ritz, K. (2000). Food preference of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia*. 44, 666–676. DOI: 10.1078/S0031-4056(04)70080-3
- Brawn, J.D., Robinson, S.K. y Thompson F.R. (2001). The role of disturbance in the ecology and conservation of birds. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 32, 251-276. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114031>
- Calderón, R. A, y Serpa, I. R. F. (2003). Efectos del paraquat sobre el crecimiento y la morfología de la microalga *Ddunaliella tertiolecta*. *Ecología Aplicada*. 2(1),99-102. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=34120115>
- Camacho-Morales, L.R., Gerardo-Gerardo, J.L., Guillen, N.K. y Sánchez, J.E. (2017). Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca. *Asociación Argentina de microbiología*, 49 (2), 189-196. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213051384008>

- Cañas, A. I. y Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*. 28, 694-705. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.002
- Castillejos, M. S. (2015). *Producción de lacasas a partir de hongos ligninolíticos utilizando vinazas y bagazo de mezcalero* (Tesis Maestría). Universidad Tecnológica de la Mixteca. URL: <http://repositorio.utm.mx:8080/jspui/handle/123456789/77>
- Castillo, G. G. (13 de septiembre de 2007). La Secretaría de la Defensa Nacional (Sedena) reserva el nombre del químico usado para erradicar plántos de drogas. *La Jornada*, pp. 1-2. URL: <https://www.jornada.com.mx/2007/09/13/index.php?section=politica&article=022n1pol>
- Catalogo Oficial de Plaguicidas. (1991). Diario Oficial de la Federación. <http://legismex.mty.itesm.mx/cico/cata001.txt>
- Cervantes-Martínez, J., Orihuela-Equihua, R. y Rutiaga-Quiñones, J. G. (2017). Acerca del desarrollo y control de microorganismos en la fabricación de papel. *ConCiencia Tecnológica*. URL: https://www.redalyc.org/journal/944/94454631001/html/#redalyc_94454631001_ref13
https://www.redalyc.org/journal/944/94454631001/html/redalyc_94454631001_ref13
- Chan, C. W., Heredia, A. G., Rodríguez, V. R. y Arias, M. M. R. (2014). Toxicidad *in vitro* de los herbicidas Atrazina y paraquat sobre el crecimiento vegetativo y la esporulación de hongos saprobios del suelo. *Rev. Int. Contam. Amb.* 30 (4), 393-406. URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018849992014000400007&lng=es&tlng=es.
- Chávez, V., J. F., Enríquez, D. M. y Aldana, A. D. (2017). Efecto de la temperatura y la acidificación en larvas de *Strombus gigas* (Mesogastropoda: Strombidae). *Revista de Biología Tropical*. 65(2), 505-515. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44950834006>
- Coimbra, V.R.M. (2015). Checklist of Central and South American Agaricales (Basidiomycota) II: Strophariaceae. *Mycosphere*. 6 (4), 441-458. DOI:10.5943/mycosphere/6/4/6
- Connell, J.H. (1979). Intermediate-disturbance hypothesis. *Science*. 204, 1344-1345. DOI: 10.1126/science.204.4399.1345
- Cuevas, J.A. (2016). Los Hongos: Héroes y Villanos de la Prosperidad Humana. *Revista Digital Universitaria*, 17(9), 1-10. URL: <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num9/art69/>
- Dávila, G. y Vázquez-Duhalt. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *ResearchGate*. 30, 29-55. URL:

- https://www.researchgate.net/publication/259781170_Enzimas_ligninoliticas_fungicas_para_fines_ambientales
- Deleé, W., Oneil, C., Hawkes, F. R. y Pinheiro, H. M. (1988). Anaerobic treatment of textil effluents: A review. *J Chem Tech Biotechnol.* 73, 323-335. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199812\)73:4<323::AID-JCTB976>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199812)73:4<323::AID-JCTB976>3.0.CO;2-S)
- Della, A.B. (2004). *Impacto del herbicida paraquat sobre invertebrados acuáticos* (Tesis Posdoctorado) Ciencias Ambientales Universidad de Buenos Aires. URL: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n3764_DellaPenna
- Desai, S. S. y Nityanand, C. (2011). Microbial laccases and their applications: A review. *Asian J Biotechnol.* 3 (2), 98-124. DOI: 10.3923/ajbkr.2011.98.124
- Dinis, O.R.J., Remiao, F., Carmo, H., Duarte, J.A., Navarro, S.A., Bastos, M.L. y Carvalho, F. (2006). paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 27, 1110-1122. DOI: 10.1016/j.neuro.2006.05.012
- Duarte-Trujillo, A.S., Jiménez-Forero, J. A., Pineda-Insuasti, J. A., González-Trujillo, C. A. y García-Juárez, M. (2020). Extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) por maceración dinámica. *Acta Biol. Colomb.* 25(1),30. DOI: <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.72409>
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P. y Kumar, A. (2011). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 68:117–128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
- Estrada, S., G. I. y Ramírez G. M.C. (2019). *Micología general*. Centro Editorial Universidad Católica de Manizales, 36-40.
- Fang, W., Fernandes, E.K.K., Roberts, D.W., Bidochka, M.J. y Leger, R.J. (2010). A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. *Fungal Genetics and Biology.* 47, 602-607. DOI: 10.1016/j.fgb.2010.03.011
- Feijóo-Vivas, K., Bermúdez-Puga, S. A., Hernán-Rebolledo, Figueroa, J. M., Zamora, P. y Naranjo-Briceño, L. (2021). Fungal mycelium-bioproducs development: A new material culture and its impact on the transition to a sustainable economy. *Revista Bionatura.* 6(1). DOI: 10.21931/RB/2021.06.01.29
- Ferrer-Romero, J. C., Mas-Diego, S. M., Beltrán-Delgado, Y., Morris-Quevedo, H. J. y Díaz-Fernández, U. (2019). Estudio cinético de la producción de biomasa y compuestos fenólicos por *Pleurotus ostreatus* en fase sumergida. *Revista Cubana de Química.* 31(1), 16-30. URL: <https://www.researchgate.net/publication/332121378>

- Foster, D.R. (2000). Conservation lessons and challenges from ecological history. *Forest History Today Fall*. 2-11. URL: https://harvardforest.fas.harvard.edu/sites/default/files/Foster_ForestHistToday_2000.pdf
- Fridovich, I. y Hasson, H. M. (1979). paraquat and the exacerbation of oxygen toxicity. *Trends in Biochemical Sciences*. 4, 113-115. URL: [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(79\)90395-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(79)90395-5)
- Galindo-Flores, G.L., Álvarez-Sánchez, J. y Anaya-Lang, A.L. (2015). Simbiosis ectomicorrízica: evidencia fisiológica, bioquímicas y moleculares que regulan su formación. Montiel, G. A.M., Hernández, C. L. V. y Estrada, T.A. *Interacciones Biológicas* (pp. 57-76). Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- García, A. L., Sánchez T. L., Padilla, S. L. y Giraldo G. G. (2012). Degradación de celulosa en desechos orgánicos domésticos en los extractos sociales 1 y 2 utilizando *Aspergillus niger*. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*. 11, 27-32. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231125817003>.
- García, J.M., Sarmiento, L.F., Salvador, M. y Porras, L.S. (2017) Uso de bioindicadores para la evaluación de la calidad del agua en ríos: aplicación en ríos tropicales de alta montaña. *Revisión corta, UGCiencia*, 23, 47-62. DOI: <http://10.18634/ugcj.23v.Oi.659>
- Ghoul, M. y Chebil, L. (2012). Enzymatic polymerization of phenolic compounds by oxidoreductases. *Springer Dordrecht Heidelberg New York London*. DOI:10.1007/978-94-007-3919-2
- González, G. P. (2021). *Caracterización de una lacasa producida por A. pediades en medio líquido y determinación del efecto del cobre y hexaclorobenceno como posibles inductores*. (Tesis Maestría). Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala.
- González, A. C., Robledo, M.L., Medina, D.I., Velázquez, F.J., Girón, P.M., Quintanilla, V.B., Ostrosky, W.P., Pérez, H.N. y Rojas, G.A. (2010). Patrón de uso de plaguicidas en Nayarit, México. *Rev. Int. Contam. Amb*. 26, 221-228. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37014384005>
- González, M. L. C. y Hansen, A. M. (2009). Adsorción y mineralización de atrazina y relación con parámetros de suelos del DR-063 Guasave, Sinaloa. *Rev. Mex. Cienc. Geol*. 26, 587-599. URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102687742009000300004&lng=es&tlng=es.
- González, M. S. Diamont, P. D. y Gutiérrez, B. (2011). Técnica de tinción de estructuras fúngicas con colorantes vegetales como una alternativa no

- contaminante. *Bioagro*.23(1),65-68. URL: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S13163361201100010009&lng=es&tlng=es.
- González, T., Yagüe, S., Terrón, M. C., Carbajo, J. M., Arana, A., Téllez, A. y González, A. E. (2006). Enzimas fúngicas: ¿una alternativa para la decoloración de los efluentes de destilería? *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 1,3-12. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223121549001>
- Gowan® México (2021, 24 de agosto). Ficha técnica paraquat. URL: <https://mx.gowanco.com/es/productos/paraquat-200>
- Gramoxone® (2022, 17 de octubre). Ficha técnica. URL: <https://www.syngenta.com.mx/sites/g/files/zhg501/f/media/2019/09/09/gramoxone.pdf?token=1568054589>
- Gunderson, L.H. y C.S. Holling. (2002). *Panarchy: Understanding transformations in human and natural systems*. Island Press, Washington, D.C. URL: <https://islandpress.org/books/panarchy>
- Halama, M. (2016). *Agrocybe putaminum* (Agaricales, Basidiomycota), New For Poland. *Polish Botanical Journal*. 61(2), 293–299. DOI: 10.1515/pbj-2016-0022
- Haley, T.J. (1979). Review of de toxicity of paraquat. *Clin Toxicol*. 14,1-46. DOI: 10.3109/15563657909030112
- Heitman, J. (2005). *Cell biology: A fungal Achilles' heel*. *Science*. 309, 2175-2176. DOI: 10.1126/science.1119321
- Hernández, A. (2021). *Análisis de la capacidad de crecimiento de Agrocybe pediades en presencia de hexaclorobenceno* (Tesis maestría). Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.
- Hernández, C. L. V., Estrada, T. A. y Rodríguez, P. M. M. (2013). La sorprendente naturaleza de los hongos. Estrada, T. A., Briseño, Z. L.V., Cruz, C. C. A. y Luna, H. V. *Hongos: diversidad, importancia, impacto y potencial en los ecosistemas y el desarrollo humano* (pp. 21-55). Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Hernández, H. N. A. y Martínez, A.M. (2006). Intoxicación por paraquat. *Salud en Tabasco*. 1, 302-305. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48760104>
- IBM® SPSS® Statistics. (2017). *Statistics*. (Versión 25.0) [software]. www.ibm.com/legal/copytrade.shtml
- ImageJ. (2021). ImageJ (version 1.8.0) [software] <http://imagej.softonic.com>

- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24(1), 14-21. URL: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522009000100002&lng=es&tlng=es.
- Intrakam. (2007). Ficha técnica del regulador de pH Sinercid Buffer (en línea). URL: <http://intrakam1.com.mx/productos/hojastecnicas/HT%20SINERCID%20BUFFER.pdf>
- Jaszek, M., Grzywnowicz, K., Malarczyk, E., Leonowicz, A. (2006). Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 85, 147-154. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.01.002
- Kuhar, F., Castiglia, V. y Papinutt, L. (2013). Reino Fungi: Morfología y estructuras de los hongos. *Revista Boletín Biológica*. 28, 11-28. URL: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/7765>
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. (2006). Laccases and their applications: A patent review. *Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC. España*. DOI: 10.2174/187220808783330965
- León-Verastegui, Á. G. (2012). Enfermedad de Parkinson por exposición ocupacional a paraquat. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 50 (6), 665-672. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457745498014>
- Levin, L., Diorio, L., Grassi, E. y Forchiassin, F. (2012). Grape stalks as substrate for white rot fungi, lignocellulolytic enzyme production and dye decolorization. *Asociación Argentina de Microbiología*. 44 (2), 105-112. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213024208010>
- Li, M., Guoqing, Z., Hexiang, W., y Tzibun N. (2010). Purification and Characterization of a Laccase from the Edible Wild Mushroom *Tricholoma mongolicum*. *J. Microbiol. Biotechnol*. 20(7), 1069-1076. URL: <https://doi.org/10.4014/jmb.0912.12033>
- López, F. L. (2013). *Papel de la N-glicosilación de proteínas en la virulencia de Fusarium oxysporum* (Tesis doctorado). Universidad de Córdoba. España. URL: <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/11343>
- López, M. R. (2005). Ecología de los hongos patógenos para el hombre. *Revista Mexicana de Micología*. 21, 85-92. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88302114>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). *Protein measurement with the Folin Phenol Reagent*. *Journal of Biological Chemistry*. 193,265–275. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>

- Madeley, J. (2002). paraquat el controvertido herbicida de Syngenta. Declaration Swedish Society for Nature Conservation. Pesticide Action Network UK. Pesticide Action Network Asia Pacific. Foro *Emaús*. URL: <https://xdoc.mx/documents/el-controvertido-herbicida-de-syngenta-rapal-5ccdf1eb688c5>
- Manson, H. R., Jardel, P. J. E., Jiménez, E. M., Escalante, S. C. A., Martínez, R. M., Jardel, P. E. J., Asbjornsen, H., Contreras, M. S., Rodríguez-Trejo, D. A., Santana, C. E., Arreola, M. V. A., Manson, H. R., Sánchez-Cordero, V., Magaña, R. V. y Gómez, M. L. (2009). Perturbaciones y desastres naturales: impactos sobre las ecorregiones, la biodiversidad y el bienestar socioeconómico. *Capital Natural de México. Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México.* 2, 131-184. URL: http://www2.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20II/II03_Perturbaciones%20y%20desastres%20naturales_Impactos%20sobre.pdf
- Martín-Mex, R., Cauich-Rejón, J.A., Montejo-Canul, E. E. y Quijano, R. A. (2017). Hongos fitopatógenos asociados a enfermedades en orquídeas cultivadas en la Península de Yucatán. *Centro de Investigación Científica de Yucatán.* 9, 203-208. URL: http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
- McNeill, J.R. (2000). Something new under the sun. An environmental history of the twentieth- century. W.W. Norton, Nueva York. DOI:10.1353/jsh.2002.0109
- Méndez, A., M. y Navarro, B., J. (2014). *Introducción a la biología*. Santiago, Chile. Sociedad Chilena de Evolución.
- Mikolasch, A. y Schauer, F. (2009). Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrids molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 82, 605– 624. DOI: 10.1007/s00253-009-1869-z
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Minussi, R. C., Pastore, G. M. y Durán, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol.* 13 (6), 205–216. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00155-3)
- Moreno, G., Esteve-Raventòs, F., Lllana, C., Blanco, M. y Rejos, J. (2010). Hongos del campus y sus alrededores. Universidad de Alcalá.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V. y Yaropolov, A.I. (2007). "Blue" laccases. *Biochemistry.* 72, 1136-1150. DOI: 10.1134/s0006297907100112
- Morris, M. y Villmann, M. (2006). Echinocandins in the management of invasive fungal infections. *Am J Health Syst Pharm.* 63, 1813-20. DOI: 10.2146/ajhp050464.p2
- Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., Kandam, K. y Sato, T. (2003). Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from

- Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology*. 149, 2455-2462. DOI: 10.1099/mic.0.26414-0
- Oliva, T. A. (2017). *Integración de enzimas lacasas en el proceso de producción de etanol de lignocelulosa: efecto sobre la hidrólisis enzimática y la fermentación* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid.
- ORIGIN®2021. (2021). Graphing & Analysis (Versión 2021). [software]. <http://www.etgroup.site/originpro-2021/>
- Orozco, G. G. (2021). La sobre-expresión de PtCSP4 del álamo promueve un mayor potencial para la fitorremediación de PCB. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 12 (65). URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S200711322021000300134&script=sci_abstract
- Ortega, Á. R. (2018). *Aislamiento, identificación, crecimiento in vitro y conservación de basidiomicetos saprótrofos de un bosque de Juniperus* (Tesis Maestría). Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala.
- Pardavé, D., Lidia, M., Flores, P. L., Ruiz, E., Franco, V. y Castañeda, R., R. C. (2012). Los Agaricales del estado de Aguascalientes. *Investigación y Ciencia*. 20(54), 3-11. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67424408001>
- Pardo-Plaza, Y. J., Paolini-Gómez, J. E. y Cantero-Guevara, M. E. (2019). Biomasa microbiana y respiración basal del suelo bajo sistemas agroforestales con cultivos de café. *Rev. U.D.C.A Act. y Div. Cient.* 22(1), 144. URL: <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n1.2019.1144>
- Paredes-Juárez, A. K., Villegas-Villareal, E., Díaz-Godínez, R. y Díaz-Godínez, G. (2017). Aplicaciones de las enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus*. *Mexican Journal of Biotechnology*. 2 (1), 135-144. URL: <https://biblat.unam.mx/es/revista/mexican-journal-ofbiotechnology/articulo/aplicaciones-de-las-enzimas-lacasas-de-pleurotus-ostreatus>
- Paz, M. M. (2011). Biodiversidad escondida. Diéguez, U.J. *Biodiversidad el mosaico de la vida* (pp. 55-68). Fundación Española para la Ciencia y Tecnología.
- Pereira, C. G., Herrera, S. J., Machuca, H. A. y Sánchez, O. M. (2007). Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque (Valdivia)*. 28(3), 215-219. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002007000300005>
- Pickett, S.T.A. y White, P.S. (1985). *The ecology of natural disturbance and patch dynamics*. Academic Press, Orlando.
- Picón, R.M. (2007). Macromicetos de las dunas del litoral cantábrico II. Picón, R. M. ZIZAK (pp. 51-55). *Revista de Micología*. ISSN 1699-0692
- Piepenbring, M. (2015). *Introducción a la Micología en los Trópicos*. The American Phytopathological Society. (pp. 366). DOI: <https://doi.org/10.1094/9780890546147.001>

- Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Microbiol Biotechnol.* 57,20-33. DOI: 10.1007/s002530100745
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología.* 25, 78-82.DOI: [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Power, P. G. (2009). El calentamiento global y las emisiones de carbono. *Ingeniería Industrial.* (27),101-122. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=337428493007>
- Racines-Oliva, M., Tamayo-Gutiérrez, E., Jarrín, M., Báez, F. y Tello, C. (2019). Alternativas de control orgánico *in vitro* para *Dactylonectria torresensis* en la mora de castilla (*Rubus glaucus*) en Ecuador. *Enfoque UTE.* 10(4), 67-77. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=572260689012>
- Reice, S.R. (2001). The silver lining: The benefits of natural disasters. *Princeton University Press, Princeton.*
- Reyes-Ocampo, I., González-Brambila, M. y López-Isunza, F. (2013). Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 12(1), 41- 56. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62028007005>
- Roa, C. A.V. y Rosas, R. Q. (2013). La Biosíntesis de las Poliaminas en el Hongo Fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*. *Rev. Mex. de Fitopatología.* 31 (1). URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000100005
- Rodríguez, C. S. y Toca, H. J. L. (2007). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv.* 24, 500-513. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003
- Rodríguez, S. E. (2006). *Caracterización molecular de lacasas de Pleurotus eryngii: expresión heteróloga de las enzimas y aplicación en la degradación de contaminantes aromáticos* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid.
- Rojas, R. L. (2013). Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisorio con impacto en la agricultura. *Fitosanidad.* 17(1),49-55. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209128776009>
- Rojas, V. G. (2010). Producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en Nuevo León. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Román, R., Torres-Duarte, C., Ayala, M. y Vázquez-Duhalt, R. (2010). Producción a escala piloto de lacasa de *Corioloopsis galilea*. *Revista Mexicana de Micología.* 32, 19-27. URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018731802010000200003&lng=es&tlng=es.

- Romme, W.H., Everham, E. H., Frelich, L. E., Moritz, M. A. y Sparks, E. E. (1998). Are large, infrequent disturbances qualitatively different from small, frequent disturbances? *Ecosystems*. 1, 524-534. URL: <https://www.jstor.org/stable/3658750>
- Ruiz, L., Lannacone, J., Tocco, I., Ruiz, A. y Harirchian, P. (2018). Acción de *Pleurotus ostreatus* Kumm en la remoción de colorante azul turquesa en biorreactores AIR LIFT. *The Biologist (Lima)*. 16 (2), 221-235. DOI: <https://doi.org/10.24039/rtb2018162244>
- Saeki, M. y Toyota, K. (2004). Effect of bensulfuron-methyl (a sulfonylurea herbicide) on the soil bacteria community of a paddy soil microcosm. *Biol. Fertil. Soils*. 40, 110-118. DOI:10.1007/s00374-004-0747-1
- Salazar-Vidal, V. E. (2019a). Generalidades de los hongos. Salazar-Vidal, V. E. *Manual de micología básica: introducción al estudio de los hongos* (pp. 16-34). ResearchGate. URL: https://www.researchgate.net/publication/333774015_Manual_de_Micologia_Basica
- Salazar-Vidal, V. E. (2019b). Taxonomía de los hongos. Salazar-Vidal, V. E. *Manual de micología básica: introducción al estudio de los hongos* (pp. 37-40). ResearchGate. URL: <https://www.researchgate.net/publication/33377401>
- Sánchez, H. F. (2021). *Estudios de generación y regeneración de protoplastos y fructificación monocariótica in vitro de Agrocybe pediades* (Tesis Licenciatura). Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala.
- Sánchez, J.E. y Royse, D. (2001). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* UTEHA. (27-47).
- Santiago, M. G.M., Galindo, F.G.L. y Castillo, G. C. (2013). Los hongos en la naturaleza. Estrada, T. A., Briseño, Z. L.V., Cruz, C. C. A. y Luna, H. V. *Hongos: diversidad, importancia, impacto y potencial en los ecosistemas y el desarrollo humano* (pp. 71-101).
- Schwartzberg, L. (2019). Hongos fantásticos [película documental]. TV-14.
- Sebiomo, A., Ogundero, V.W. y Bankole, A. (2011). Effect of four herbicides on microbial population, soil organic matter and dehydrogenase activity. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 770-778. DOI: 10.5897/AJB10.989
- Sharma, M., Chaurasia, P.K., Yadav, A., Yadav, R.S.S., Yadava, S. y Yadav, K.D.S. (2016). Purification and characterization of a thermally stable yellow laccase from *Daedalea flavigra* MTCC-145 with higher catalytic performance towards selective synthesis of substituted benzaldehydes. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 42(1), 59-68. URL: <https://doi.org/10.1134/S1068162016010143>

- Shraddha, R. S., Sehgal, S., Kamthania, M. y Kumar, A. (2011). Laccase: Microbial, sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res.* DOI: 10.4061/2011/217861
- Silva-León, S. (2019). *Efecto de la temperatura sobre la producción de enzimas lacasas expresadas por Agrocybe cf. pediades cultivado en medio sólido* (Tesis Licenciatura). Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala.
- Solomon, E. I., Baldwin, M.J. y Lowery, M.D. (1993) Electronic structures of active sites in copper proteins. *Chemical Review.* 92, 521-542. DOI: 10.1021/ba-1995-0246.ch005
- Soto, G. J. L., Andrade, S.M., Mestas, Z.P., Motta, O.M. y Soto, G.H.H. (2009). Impacto de herbicidas sobre microorganismos disolventes de fosfatos en suelo rizosférico de plantas de *Solanum tuberosum*. *Revista Teoría y Praxis Investigativa.* 5, 11-20. URL: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3702389.pdf>
- Syngenta. (2021, 24 de agosto). Ficha Técnica GRAMOXONE. URL: https://www.syngenta.com.mx/sites/g/files/zhg501/f/media/2019/09/09/gram_oxone.pdf?token=1568054589
- TECNOAGRICOLA. (2021). paraquat 25. Portal TECNOAGRICOLA. URL: <https://www.buscador.portaltecnog agricola.com/vademecum/mex/producto/PARAQUAT%2025>
- Téllez-Téllez, M, Fernández, J. F, Montiel-González, A. M, Sánchez, C. y Díaz-Godínez, G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 81: 675-679.
- Terradas, J. (2001). *Ecología de la vegetación. De la ecofisiología de las plantas a la dinámica de comunidades y paisajes.* Ediciones Omega, Barcelona.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140,19-26. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>
- Toro-Restrepo, B. (2011). Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Revista Luna Azul.* (32),121-127. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321727234011>
- Torres, G, D. (2017). *Evaluación de la expresión de enzimas ligninocelulolíticas de dos especies de hongos saprótrofos aislados de un bosque de Juniperus en Tlaxcala.* (Tesis Maestría). Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Tóth, A., Hausknecht, A., Krisai-Greilhuber, I., Papp, T., Vágvölgyi, C. y Nagy, L. G. (2013). Iteratively refined guide trees help improving alignment and phylogenetic inference in the mushroom family Bolbitiaceae. *PLoS One.* 8(2). DOI: 10.1371/journal.pone.0056143

- Valdés, S., Garita, C., Esquivel, C. y Villegas, L. R. (2020). Aislamiento y purificación de la enzima lacasa: evaluación de su potencial biodegradador en residuos agrícolas. *Bio. Tecnología*. 24 (2), 29-45. URL: <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2020/08/6-Valdes-et-al-2020.pdf>
- Vélez-Páez, J. (2021). Lactato: Fisiología, Bioquímica y Metabolismo de la Producción Energética Celular. *INSPIPILIP*. 5(1). URL: <https://doi.org/10.31790/inspilip.v5i1.6>
- Vinícius, M. C. A., Cláudio, S., Costa de Oliveira, R. y Nunes, R. (2013). Gene expression modulation by paraquat-induced oxidative stress conditions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology*, 90, 101-109. DOI: 10.1016/j.fgb.2013.05.004
- Walther, G. y Wei, M. (2006). Anamorphs of the Bolbitiaceae (Basidiomycota, Agaricales). *Mycologia*. 98 (5), 792-800. DOI: 10.3852/mycologia.98.5.792
- Webster, J. y Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, New York. URL: <http://deskuervis.nic.in/pdf/WEBSTER30521807395.pdf>
- White, P.S., y A. Jentsch. (2001). *The search for generality in studies of disturbance and ecosystem dynamics*. *Progress in Botany*. 62, 399-450. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-56849-7_17
- Yoshida, H. (1883). Chemistry of Lacquer (Urusbz). *Journal of Chemistry*, 43,472-486. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/ct8834300472>
- Zuleta, R. R. (2007). Hongos, una huella biológica ancestral. *ResearchGate*. 1, 9-12. URL: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol22num3/articulos/hongos/index.html>

11. ANEXOS

Preparación de los medios de cultivo extracto de malta y agar bacteriológico

- 17 g/L EM
- 15 g/L Agar bacteriológico

Medio mineral mínimo en glucosa*

- 5 g/L glucosa
- 1 g/L Extracto de levadura
- 2 g/L KH_2PO_2
- 0.5 g/L KCL
- 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Rojas, 2010; Modificado por Hernández (2021)

*para el control sin glucosa (S/G) se utilizó el mismo medio sin glucosa

Tabla 2. Concentraciones de paraquat utilizadas al inicio del cultivo (se agregó directamente en el medio)

Concentraciones utilizadas (mg/L)	Dosis calculadas a partir de la concentración comercial (mL/L)
20	0.08
40	0.16
60	0.24
80	0.32
100	0.4

Tabla 3. Preparación de las concentraciones de paraquat agregadas a las 72 horas de cultivo (30 mL de medio por matraz).

Concentraciones utilizadas (mg/L)	Dilución para 50 mL de H ₂ O _d estéril calculadas a partir de la formula comercial (ppm)	Volumen tomado para cada matraz
5	1 200	125 µL
10	3 400	
15	3 600	
20	4 800	
40	9 600	
60	14 400	
80	19 200	
100	24 000	

Tabla 4. Cálculos para las concentraciones de paraquat utilizando 50 mL de medio de cultivo (a las 72 horas)

Concentraciones utilizadas (mg/L)	Dilución para 50 mL de H ₂ O _d estéril calculada a partir de la formula comercial (ppm)	Volumen tomado para cada matraz
5	2 000	125 µL
2	800	